Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG
Berlin/Bergkamen

Untersuchungen über mögliche endokrinologische und ernährungsbedingte Einflüsse auf den Insulinabbau am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
an den Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Waltraut Flacke
aus Lüneburg

Berlin 1975

1976

Aus den Forschungslaboratorien der Schering AG
Berlin/Bergkamen

Untersuchungen über mögliche endokrinologische und ernährungsbedingte Einflüsse auf den Insulinabbau am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
an den Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Waltraut Flacke

aus Lüneburg

Berlin 1975

Referent: Prof. Dr. Dr. E. Gerhards

Korreferent: Prof. Dr. R. Keller

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Promoviert am: 4. Juni 1976

Inhaltsverzeichnis Seite

1. Einleitung 6

2. Beschreibung der Praktik 20

2.1 Reagenzien, Geräte, Tiermaterial, Methoden 20
2.2 Pufferzusammensetzung 23
2.3 Versuchsaufbau 25
2.4 Operationsablauf 27
2.5 Versuchsablauf 31
2.5.1 Tier-Vorbehandlung 31
2.5.2 "Aufbereitung" der Humanerythrozyten 32
2.5.3 Vorbereitung der Perfusion 33
2.5.4 Durchführung der Perfusion 33
2.5.5 Aufarbeitung des Mediums 35

3. Ergebnisse der Leberperfusionsversuche 36

3.1 Untersuchungen zur Leberfunktion unter Perfusionsbedingungen 36
3.1.1 Zur Frage der Sauerstoffversorgung der Leber ... 36
3.1.1.1 Leberperfusionen mit Erythrozyten-freiem Medium. 36
3.1.1.2 Leberperfusionen mit Erythrozyten-haltigem Medium 39
3.1.1.3 "Leerperfusions"-Versuche mit Erythrozyten-haltigem Medium 41
3.1.2 Prüfung der Insulinstabilität im Erythrozyten-haltigem Medium 43
3.1.3 Prüfung der Insulinstabilität in Gegenwart eines Antibioticums im Perfusionsmedium 45
3.1.3.1 Inkubationsversuche mit Aureomycin 46
3.1.3.2 Inkubationsversuche mit Aureomycin unter verschiedener Begasung 47
3.1.3.3 "Leerperfusionen" mit Aureomycin-haltigem Medium 49
3.1.3.4 Inkubationsversuche mit Penicillin 51

Inhaltsverzeichnis Seite

3.1.3.5 Inkubationsversuche mit Penicillin im nicht begasten Medium 53

3.2 Untersuchungen zur Brauchbarkeit des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber zum Studium des Insulinabbaus 55

3.3 Untersuchungen über mögliche endokrinologische und ernährungsbedingte Einflüsse auf den Insulinabbau am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber 64

3.3.1 Insulinabbau in der Leber 24 Std. nüchterner, unbehandelter Ratten 64

3.3.2 Insulinabbau in der Leber gefütterter Ratten ... 68

3.3.3 Insulinabbau in der Leber von 96 Std. nüchternen Ratten 71

3.3.4 Insulinabbau in der Leber adrenalektomierter Ratten 74

3.3.4.1 Insulinabbau in der Leber substituierter, adrenalektomierter Ratten 76

3.3.4.2 Insulinabbau in der Leber adrenalektomierter Ratten nach Substitution mit Fluocortolon 78

3.3.5 Insulinabbau in der Leber hypophysektomierter Ratten 81

3.3.6 Insulinabbau in der Leber Streptozotocin-diabetischer Ratten 84

3.3.7 Insulinabbau 24 Std. nüchterner Ratten unter dem Einfluß der oralen Antidiabetica Tolbutamid und Glymidin-Na 87

3.3.7.1 Untersuchungen mit Tolbutamid im Perfusionsmedium 87

3.3.7.2 Leberperfusionen nach Marshall mit Tolbutamid im Perfusionsmedium 88

3.3.7.3 Untersuchungen mit Glymidin-Na im Perfusionsmedium 91

3.3.8 Insulinabbau in der Leber 24 Std. nüchterner Ratten unter dem Einfluß von Glucagon im Perfusionsmedium 94

Inhaltsverzeichnis Seite

3.4 Zusammenfassung der nach Lineweaver-Burk graphisch ermittelten V_{max}- und K_m-Werte 98

3.5 Blutzucker und Leberglykogengehalte 99

4. Diskussion der Ergebnisse ... 102

5. Zusammenfassung 115

6. Literaturangaben 118

Lebenslauf 125

1. EINLEITUNG

Insulin wird in vivo rasch abgebaut (1-3). Es ist bereits seit langem bekannt, daß die biologische Aktivität des Insulins in vitro durch Homogenate, Extrakte und Schnitte der Leber zerstört wird (4-6). LEHMANN und SCHLOSSMANN (7) zeigten bereits 1938, daß Extrakte von Kaninchenmuskeln Insulin inaktivieren. Obgleich schon wenige Jahre nach der Isolierung des Hormons durch BANTING und BEST, der mit einer Inaktivierung verknüpfte Insulinabbau erstmals beschrieben wurde, begannen erst Ende der vierziger Jahre umfangreiche Untersuchungen zum Insulinabbau durch die Arbeitsgruppe MIRSKY mit dem Ziel, die Genese des Diabetes mellitus eventuell auf Veränderungen des Insulinabbaus zurückzuführen.

Schon in den ersten Arbeiten charakterisierte man den Insulinabbau als eine enzymatische Reaktion und nannte das abbauende System "Insulinase" (4, 8, 9, 10). Dabei wurde die "Insulinase"-Aktivität durch die Abnahme der hypoglykämischen Wirkung des Insulins nach Inkubation mit Homogenaten und Gewebeschnitten bestimmt. Je stärker die hypoglykämische Wirkung des Mediums nach der Inkubation abnahm, desto höher war die "Insulinase"-Aktivität.

Nachdem Anfang der fünfziger Jahre Jod^{131}-markiertes Insulin zur Verfügung stand, wurden die Untersuchungen zum Insulinabbau in vivo und in vitro mit so radioaktiv-markiertem Insulin durchgeführt (3, 11, 12, 13, 14). Dabei wurde nach der Inkubation des Gewebes mit Jod^{131}-markiertem Insulin durch Eiweißfällung z.B. mit Trichloressigsäure präzipitiert. Die nicht präzipitierbare Jod^{131}-Aktivität im Überstand wurde als Meßgröße für die "Insulinase"-Aktivität des inkubierten Gewebes benutzt. Mit dieser Methode wurde das Vorkommen von "Insulinase"-Aktivität in zahlreichen Geweben nachgewiesen. Die höchste Aktivität fand sich in Homogenaten und Extrakten von Lebern. Die Untersuchungen wurden an Ratte, Maus, Meerschwein, Katze, Kaninchen, Kuh, Huhn, Ente, Affe und Mensch

durchgeführt.

Die auf Gewichtseinheit Leberprotein bezogene "Insulinase"-Aktivität zeigte bei den untersuchten Spezies deutliche Unterschiede. Besonders hohe Werte wurden in der Leber von Katzen, Kaninchen und Menschen nachgewiesen (15).

Die "Insulinase"-Aktivität in Rattenleberextrakten wird bei pH 4,2 fast vollständig präzipitiert (MIRSKY, Rev. 1957). Die "Insulinase"-Aktivität kann durch Einstellen des Präzipitates auf pH 7,8 wieder weitgehend in Lösung gebracht werden. Die Enzymaktivität wird durch SH-Reagenzien wie z.B. p-chloromercuribenzoat oder Jodacetat sowie Schwermetallionen wie z.B. Kupfer und Zink "inaktiviert". Bereits in den ersten Arbeiten über die "Insulinase" versuchte man Anhalte zur möglichen Spezifität zu erhalten. So bestand z.B. keine Korrelation zwischen dem Abbau des Hämoglobins und der Inaktivierung des Insulins. Weiterhin wurde Insulin durch andere Gewebe wie z.B. Gehirn und Erythrozyten kaum abgebaut, obwohl diese reich an Proteasen und Peptidasen sind. Einen weiteren Hinweis zur Spezifität der "Insulinase" resultierte aus Untersuchungen mit Jod-markiertem Lysozym, Chymotrypsin und Serum-Albumin, die im Gegensatz zum markiertem Insulin durch Leberextrakt praktisch nicht abgebaut werden. Unter gleichen Bedingungen wurden aber Pepsin, Ribonuclease und Prolaktin in geringem Maße abgebaut.

Bei gleichzeitiger Inkubation verschiedener Proteine wie Human-Serum-Albumin, Rinder-Plasma-Albumin, Lactalbumin und Ribonuclease mit Jod-markiertem Insulin war der Insulinabbau, gemessen an der nicht präzipitierbaren Jod-Aktivität, nicht gehemmt. Im Gegensatz dazu war der Insulinabbau in Gegenwart von Casein, ACTH, Glucagon und STH gehemmt. Da die Proteine, die hemmend auf den Insulinabbau wirken, selbst durch Leberextrakte rasch abgebaut werden (16, 17), lag die Annahme nahe, daß die Abbauprodukte der zugesetzten Proteine den Insulinabbau beeinflußen. Für diese Annahme sprach auch, daß

der Insulinabbau durch Leberhomogenate von Hydrolysaten verschiedener Proteine gehemmt wurde. MIRSKY und Mitarbeiter zeigten, daß Insulin auch durch Leberschnitte der Ratte abgebaut wird. Die Abbaugeschwindigkeit war dabei wesentlich geringer als die einer äquivalenten Homogenatmenge (5, 13).

MIRSKY hatte bereits 1950 auf einen "Insulinase"-Inhibitor in Leberhomogenaten der Ratte hingewiesen (24). Dieser hepatische "Insulinase"-Inhibitor ist offensichtlich eine kleinmolekulare Substanz, da er gut löslich ist in Wasser, Aceton, 95 %igem Äthanol, Salzsäure und Trichloressigsäure. Er ist unlöslich in Lipidlösungsmitteln wie Äthyl- und Petroläther. In sauren Lösungen ist der Inhibitor hitzestabil, oberhalb pH 8,0 aber relativ empfindlich bei Temperaturerhöhung. Nach Untersuchungen von MIRSKY handelt es sich offensichtlich um eine kompetitive Hemmung, die auch an Leberschnitten (5) und an intakten Mäusen nachweisbar war (25).

Die in vivo und in vitro nachweisbare Hemmung des Insulinabbaus durch den hepatischen Inhibitor ist mit einem Anstieg der biologischen Insulinaktivität verknüpft. So führt z. B. die subcutane Injektion des Inhibitors eine Stunde vor einer Insulininjektion zu einer deutlich verstärkten Hypoglykämie bei Ratten und Kaninchen (26).

Die oben bereits erwähnten Hemmstoffe der "Insulinase" wie z.B. Kupfer, Zink, Quecksilber, Jodessigsäure und p-chloromercuribenzoat sind nicht kompetitive Inhibitoren, die allerdings auch bei intakten Ratten zu einem Abfall der Blutzuckerkonzentration führen. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von MIRSKY et al. (20) sowie TYBERGHEIN (27) erwähnenswert, in denen gezeigt wurde, daß ß-zytotrope Antidiabetica wie Carbutamid und Tolbutamid ebenfalls schwache nicht kompetitive Inhibitoren der "Insulinase" sind. Bei den Untersuchungen zur Natur des "Insulinase"-Inhibitors fand MIRSKY (26), daß ein Säurehydrolysat von kristallinem Insulin Hydrolyseprodukte enthielt, die eine sehr hohe Inhibitor-Aktivität

gegenüber der "Insulinase" in vivo und in vitro zeigten.

MIRSKY und PERISUTTI untersuchten die Inhibitor-Aktivität der Säurehydrolysate zahlreicher Proteine (28). Die höchste Aktivität fanden sie im Insulinhydrolysat, hohe Inhibitor-Aktivität auch im Hydrolysat von Pitressin, Pitocin, STH, Glucagon, Intrinsic Faktor und ACTH. Die Hydrolysate zahlreicher anderer Proteine waren weniger stark wirksam. Der hepatische "Insulinase"-Inhibitor war auch noch nach langdauernder Hydrolyse wirksam, wogegen die Inhibitor-Aktivität der Hydrolysate des Insulins und anderer Proteine unter gleichen Hydrolysebedingungen rasch verschwand.

Die Arbeitsgruppe von MIRSKY zeigte, daß verschiedene L-Tryptophan-haltige Peptide die "Insulinase" in vitro mehr oder minder stark hemmen (15). Das gleiche gilt auch für L-Tryptophan selbst. Diese Aminosäure führt auch bei intakten Ratten zu einer deutlichen Blutzuckersenkung (29). D-Tryptophan und 16 andere Aminosäuren wurden ebenfalls untersucht, sie waren in vivo aber unwirksam. L-Tryptophan zeigte bei alloxandiabetischen Tieren keine blutzuckersenkende Wirkung, so daß die Annahme nahelag, die L-Tryptophan-Wirkung auf den Blutzucker der Ratte auf eine Stimulation der Insulinsekretion und/oder eine Hemmung des Insulinabbaus zurückzuführen war.

Wie L-Tryptophan selbst, zeigten auch die Indolessigsäure und die Anthranilsäure als Tryptophan-Metaboliten blutzuckersenkende Wirkung bei der intakten Ratte. Im Gegensatz dazu waren aber andere wesentliche Tryptophan-Metaboliten wie die Kynurensäure, Chinolinsäure und das Nikotinsäureamid unwirksam und führten zu einer Blutzuckererhöhung. Es ist erwähnenswert, daß die Indolessigsäure auch bei nicht-diabetischen Versuchspersonen zu einer Blutzuckersenkung führte, die allerdings deutlich geringer war als nach Verabreichung eines ß-zytotropen Antidiabeticums. Bei Altersdiabetikern entsprach aber die blutzuckersenkende Wirkung der Indolessigsäure etwa der der

Sulfonylharnstoffe. MIRSKY interpretierte diese Befunde in dem Sinne, daß Sulfonylharnstoffe über eine Stimulation der Insulinsekretion, Indolessigsäure aber über eine Hemmung des Insulinabbaus wirkt.

In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß nach Untersuchungen von MIRSKY (15) Diabetiker wesentlich höhere Mengen an Indolessigsäure mit dem Harn ausscheiden als gesunde Personen. Für eine Störung des Tryptophanstoffwechsels bei Diabetikern sprechen auch Untersuchungen von ROSEN und Mitarbeiter (30), nach denen im Tryptophan-Belastungstest beim Diabetiker die Ausscheidung an Xanthurensäure stark erhöht ist.

Aufgrund der vorstehend erwähnten Befunde vermutete MIRSKY, daß die Störung im Tryptophanstoffwechsel beim Diabetiker zu einer verminderten Bildung eines möglicherweise physiologischen "Insulinase"-Inhibitors führen könnte und damit zu einem relativ vermehrten Insulinabbau.

Die bisher erwähnten Literaturbefunde sprechen für einen proteolytischen Abbau des Insulins. TOMIZAWA und HALSEY (31) gelang 1959 die Anreicherung eines insulinabbauenden Enzyms aus Rinderleber. Bereits 1953 und 1958 hatten RACKER (32) sowie NARAHARA und WILLIAMS (33) auf die mögliche Bedeutung der reduktiven Spaltung der Disulfidbindungen für den Insulinabbau hingewiesen. TOMIZAWA und HALSEY (31) zeigten, daß auch der Insulinabbau in vitro durch ihr gereinigtes Enzym aus Rinderleber durch den Zusatz von SH-Gluthation stark beschleunigt wurde. Das Enzym wurde daher als Gluthation-Insulin-Transhydrogenase bezeichnet. Unter Verwendung des von TOMIZAWA und HALSEY (31) beschriebenen Reinigungsverfahrens für das Enzym aus Rinderleber wurde die sogenannte Gluthation-Insulin-Transhydrogenase (GIT) auch im Rinderpankreas (34), in der Leber (35) und Niere (36) des Menschen nachgewiesen.

Bei dem Reinigungsverfahren für die GIT wurde ein Aceton-Trockenpulver der verschiedenen Gewebe als Ausgangsprodukt benutzt, so daß keine Aussage zur intrazellulären Lokalisation des Enzyms möglich war. ANSORGE et al. (37, 38, 39) untersuchten den Insulinabbau an verschiedenen Fraktionen der Rattenleber und wiesen in der Mikrosomen- und Lysosomenfraktion sowie im Zytosol insulinabbauende Enzymaktivität nach. Das mikrosomale sowie ein Enzymsystem des Zytosols zeigten GIT-Wirkung. Das mikrosomale Enzym mit einem Molekulargewicht von etwa 50.000 - 55.000 zeigte in vitro bei neutralem pH die höchste Aktivität. Für das zytoplasmatische Enzym wurde ein Molekulargewicht von etwa 10.000 wahrscheinlich gemacht. Die Autoren (40) konnten in dem gereinigten mikrosomalen Enzym keine proteolytische Aktivität nachweisen und äußerten die Vermutung, daß das Enzym identisch oder sehr ähnlich dem mikrosomalen Enzym sei, das die Rückbildung aktiver Ribonuclease (41, 42) aus dem oxydierten Enzym katalysiert.

Die bisher vorliegenden Befunde zur Gluthation-Insulin-Transhydrogenase erlauben noch keine Aussage über eine biologische Bedeutung des Enzyms für den Insulinabbau. Es ist nicht auszuschließen, daß über eine Steuerung des SH-Gluthationsspiegels in der Leber z. B. der Insulinabbau beeinflußt wird.

In den letzten Jahren wurden die Arbeiten zur Bedeutung des proteolytischen Insulinabbaus von verschiedenen Arbeitsgruppen weitergeführt. BRUSH et al. (43, 44) wiesen im Diaphragma und im Skelettmuskel der Ratte ein partikelgebundenes Enzym nach, das Insulin rasch abbaut. Nach Fraktionierung des Diaphragma-Homogenates war im 100.000g Überstand eine 7 - 8mal höhere Enzymaktivität als im Sediment nachweisbar. Sowohl die zytoplasmatische als auch die partikelgebundene Enzymaktivität war unabhängig von SH-Gluthation, so daß es sich dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um die Gluthation-Insulin-Transhydrogenase handelte. BRUSH (45) wies für das zytoplasmatische Enzym aus Skelettmuskulatur der Ratte eine hohe Spezifität nach.

Proinsulin und Proinsulinzwischenprodukte wurden nur mit 3-10 % der für das Insulin gemessenen Abbaugeschwindigkeit enzymatisch hydrolysiert. Proinsulin hemmte sogar kompetitiv den Insulinabbau.

Das Enzym wurde durch SH-Reagenzien, N-Äthylmaleimid und p-hydroxymercuribenzoat gehemmt. Protease-Inhibitoren wie z.B. Phenylmethylsulfonylfluorid waren aber ohne Einfluß auf die Enzymaktivität. Auch bei Zusatz zahlreicher Proteine und Polypeptide, wie z.B. Rinder-Serum-Albumin,Globin, STH, Glucagon sowie die Insulinketten A und B war der enzymatische Abbau des Insulins nicht vermindert. Die Erhöhung der Enzymaktivität bei Zusatz von SH-Gluthation erklärt sich aus der Tatsache, daß es sich bei dem insulinabbauenden Enzym um ein SH-Enzym handelt, so daß durch den Zusatz von SH-Gluthation die für die Enzymwirkung essentiellen SH-Gruppen geschützt werden.

BURGHEN, KITABCHI und BRUSH (46) zeigten, daß auch im partikelfreien Überstand der Rattenleber ein insulinabbauendes Enzym mit hoher Spezifität vorhanden ist. 96 % der im Leberhomogenat nachgewiesenen Enzymaktivität waren im 100.000g Überstand vorhanden, die restlichen 4 % in den Zelltrümmern, den Mitochondrien und in der Mikrosomenfraktion. Das insulinabbauende Enzym hat ein Molekulargewicht von etwa 80.000. Es handelt sich um eine Protease, deren Aktivität vom SH-Gluthation unabhängig ist. Das zytoplasmatische Enzym baut Insulin 15mal rascher ab als Proinsulin. Menschliches Wachstumshormon wurde praktisch nicht angegriffen. Andere proteolytische Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Papein bauten Insulin und Proinsulin mit gleicher Geschwindigkeit ab.

Es handelt sich wie bei den oben geschilderten insulinabbauenden Enzymen des Zwerchfells und der Skelettmuskulatur der Ratte um ein SH-Enzym, dessen Aktivität durch Mercaptoäthanol und SH-Gluthation geringfügig erhöht und durch SH-Reagenzien gehemmt wird. BURGHEN et al. (46) zeigten, daß das zytoplasma-

tische Enzym der Rattenleber durch orale Antidiabetica wie Phenformin und Tolbutamid nicht kompetitiv gehemmt wird. Die vorliegenden Untersuchungen sprechen für eine physiologische Bedeutung der Insulinprotease als wesentliches insulinabbauendes Enzym. Die oben beschriebene Gluthation-Insulin-Transhydrogenase wurde bei Insulinkonzentrationen, die um den Faktor 8.000 höher waren als die physiologischen Insulinkonzentrationen im Blut, nachgewiesen.

Bei dem von ANSORGE et al. (37) beschriebenen mikrosomalen von SH-Gluthation abhängigen insulinabbauenden Enzym der Rattenleber handelt es sich möglicherweise um die Gluthation-Insulin-Transhydrogenase. Die, von TOMIZAWA et al. (31) beschriebene, hohe Aktivität der GIT in der Rattenleber war erst unter Einfluß von Detergenzien (37) oder nach Aceton-Behandlung (47) nachweisbar.

Wie oben beschrieben befindet sich die Insulinprotease im partikelfreien Überstand, zeigt eine hohe Spezifität für Insulin bei physiologischen Insulinkonzentrationen und ist nicht von SH-Gluthation abhängig. KITABCHI und STENTZ (48) untersuchten den Insulinabbau im partikelfreien Überstand zahlreicher Organe der Ratte. Die Enzymaktivität nahm in folgender Reihenfolge ab: Leber, Testes, Nebenniere, Milz, Ovarien, Lunge, Herz, Skelettmuskulatur, Nieren und Fettgewebe. Für die aus Leber, Muskulatur und Niere isolierten insulinabbauenden Enzyme im 100.000g Überstand wurden weitgehend gleiche biochemische Eigenschaften nachgewiesen. In allen Fällen wurde Insulin wesentlich rascher abgebaut als Proinsulin. Der Zusatz von ACTH, Glucagon und STH beeinflußte die Geschwindigkeit des Insulinabbaus nicht. Gegen eine wesentliche Beteiligung der GIT am Insulinabbau sprechen auch die Untersuchungen von IZZO et al. (49) mit J^{131}-markiertem Insulin. Bei Inkubationen des Jod-markierten Insulins mit partikelfreiem Überstand der Rattenleber wurde Insulin rasch proteolytisch abgebaut. Dabei waren keine isolierten A- und B-Ketten als Abbauprodukte nachweisbar.

VAUGHAN reicherte 1954 bereits aus Rattenlebern eine Enzympräparation an, die Insulin bis zu Peptiden und Aminosäuren abbaute (50, 51, 52, 53, 54). KENNY (55, 56) zeigte, daß die durch oxydativen Abbau erhaltenen A- und B-Ketten des Insulins durch rohes Leberhomogenat der Ratte rascher proteolytisch abgebaut werden als intaktes Insulin.

Im Fettgewebe wurde von RUDMAN und Mitarbeitern (57, 58) eine insulinspezifische Peptidase nachgewiesen, die das Insulinmolekül zwischen A 13 - 14, A 18 - 19 und A 11 - 12 sowie B 15 - 16 spaltet. Die dabei entstehenden Peptide wurden durch unspezifische Amino- und Carboxypeptidasen weiter abgebaut. Es ist sehr bemerkenswert, daß eines oder mehrere dieser Peptide in vitro eine ebenso hohe Aktivität zeigten wie das Insulinmolekül.

Im Hinblick auf die mögliche Regulation des proteolytischen Abbaus vom Insulin durch den intermediären Stoffwechselzustand sind kürzlich veröffentlichte Befunde von UMANA (59, 60) erwähnenswert. Bereits in früheren Arbeiten hatten verschiedene Autoren (61, 62, 63) darauf hingewiesen, daß in Gewebeschnitten der Proteinabbau bei neutralem pH-Wert durch Entkoppelung oder Hemmung der oxydativen Phosphorilierung deutlich vermindert wird. Außerdem wurde gezeigt, daß bei Gewebehomogenaten (65, 66) die Proteolyse stark erhöht wird und daß diese ATP bedingte Aktivierung, Asparaginsäure abhängig ist, eventuell über die Bildung des Asparagenyladenylates (67).

Die ATP-Aktivierung von Proteasen war in zahlreichen Organen der Ratte nachweisbar (66). UMANA (59) sieht im Aspartyladenylat einen Aktivator der Proteinase, der im Zustand einer erhöhten Proteinsynthese rasch für die Biosynthese verbraucht wird und damit als Proteinase-Aktivator nicht mehr zur Verfügung steht. Weiterhin sollte nach UMANA die Konzentration des Asparagenyladenylates durch die Konzentration an freier Asparaginsäure bestimmt sein, die ihrerseits durch das sehr effektive Transaminasesystem in der Leber bestimmt würde.

Als weitere Regulationsmöglichkeit der Proteinase diskutiert UMANA die Möglichkeit, daß Abbauprodukte des Proteins als Peptid an der aktiven Stelle der Endopeptidase gebunden und dadurch als kompetitiver Inhibitor der Proteinase wirken könnte.

Zur Frage der Regulation des Insulinabbaus

Insulin ist wesentlich an der Regulation des Blutzuckerspiegels beteiligt. Bei der Bedeutung der Blutglucose als Substrat des Energiestoffwechsels - vor allem für das zentrale Nervensystem - ist es verständlich, daß der Organismus zahlreiche Steuerungsmechanismen für die Blutzuckerkonzentration besitzt. Da das vom Pankreas sezernierte Insulin vor der Verteilung im Organismus bereits bei der ersten Leberpassage bis etwa 50 % inaktiviert wird, wäre es biologisch sehr sinnvoll, eine Steuerung des Insulinabbaus in der Leber in dem Sinne zu erwarten, daß der Organismus vor einem Überangebot an Insulin und damit wieder indirekt vor einem lebensbedrohlichen Absinken des Blutzuckerspiegels geschützt würde.

In den vergangenen Jahren wurde der Insulinabbau in vivo und in vitro unter verschiedenen Ernährungsbedingungen, bei verschiedenen pathologischen Zuständen und unter verschiedenen endokrinen Bedingungen untersucht. Die Aussagekraft der bisher vorliegenden Untersuchungen ist aber stark reduziert, da die Autoren mit Jod-markiertem Insulin und teilweise extrem hohen Insulinkonzentrationen in vitro gearbeitet haben.

Unter diesen Bedingungen fanden WILLIAMS und Mitarbeiter (68) eine Erhöhung des Insulinabbaus in vitro durch Rattenleber-Homogenate nach einer fettreichen Diät bei einer alloxandiabetischen Gruppe sowie einer adrenalektomierten Gruppe. ELGEE et al. (69) fanden in der Leber von hungernden Ratten in vitro einen geringeren Insulinabbau als bei normal ernährten Ratten. Zu dem gleichen Ergebnis kam auch BEYER (19) bei

Untersuchungen zum Insulinabbau in der Leber der Maus. Der im Hungerzustand herabgesetzte Insulinabbau in vitro wurde am raschesten nach Verabreichung einer kohlenhydratreichen Kost wieder normalisiert (70). Auch MORGAN und Mitarbeiter (71, 72) fanden in der Leber von hungernden Ratten eine verminderte "Insulinase"-Aktivität, die bei Wiederfütterung auf die normale Aktivitätshöhe zurückkehrte. Die von ihnen beobachtete, verminderte "Insulinase"-Aktivität bei alloxandiabetischen Ratten, konnte durch Insulin-Substitution wieder normalisiert werden. Die Autoren stellten die Hypothese auf, daß durch Insulin die Biosynthese der "Insulinase" in der Leber induziert würde. BARBIERI und GRASSI (73) fanden in Extrakten aus Fettlebern der Ratte einen verminderten Insulinabbau.

Die bisher zitierten Untersuchungsergebnisse wurden von einigen Autoren in dem Sinne interpretiert, daß unter Bedingungen eines niedrigen Insulinspiegels im Blut - wie z.B. beim Hungerzustand - der "Insulinase"-Spiegel in der Leber vermindert sein sollte. Die Autoren sahen darin einen biologischen Sinn, daß bei niedrigem Insulinspiegel die Leber durch eine Verminderung des Abbaus in die Homöostase des Insulinspiegels eingreifen sollte. Zu der gleichen Aussage kamen kürzlich auch UETE und TSUCHIKURA (74). Nach ihren Untersuchungen war der Insulinabbau in der Leber alloxandiabetischer Ratten herabgesetzt. Durch Insulinbehandlung ließ sich der Insulinabbau wieder normalisieren. Die Autoren sahen in ihren Untersuchungsergebnissen eine Stütze der Hypothese, daß ein Autoregulationsmechanismus für den Insulinabbau in der Leber besteht, der durch die Veränderung des Insulinspiegels im Blut in dem Sinne reguliert wird, daß bei niedrigem Insulinspiegel der Abbau vermindert, bei hohem Insulinspiegel der Abbau beschleunigt wird. Es muß an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die Autoren zu Untersuchungen des in vitro-Insulinabbaus durch die Rattenleber 1,0 ml des 18.000g Überstandes mit 0,8 mg Jod^{131}-markiertem Insulin inkubierten. Weitere Hinweise auf eine endokrinologische Beeinflussung des

Insulinabbaus wurden in kurzen Mitteilungen von SKINNER und MADISON (75) sowie MAHLER und SZABO (76) und ELGEE und WILLIAMS (22, 77) gegeben.

SKINNER und MADISON zeigten, daß nach intraportaler Injektion von Glucagon bzw. Adrenalin von dem anschließend ebenfalls intraportal injizierten Insulin ein sehr viel geringerer Anteil bei der Leberpassage gebunden wurde. Glucagon vermindert die Insulin-Bindung um 51 %, Adrenalin um 61 %. Die Autoren erklären damit die Verminderung der Insulin-bedingten Hemmung des Glucose-outputs in der Leber durch Glucagon und Adrenalin. Außerdem nehmen sie an, daß durch Glucagon und Adrenalin Insulin vermehrt und unverändert durch die Leber in die Peripherie gelangen kann.

MAHLER und SZABO fanden nach intravenöser Injektion von Rinder-Wachstumshormon bei normalen Ratten einen Blutzuckerabfall und 10 Minuten nach der Inkubation eine Verminderung des Insulinabbaus durch Leber- und Nierenschnitte in vitro. Auch nach Inkubation von Leber- und Nierenschnitten mit Wachstumshormon war nach 10 Minuten der Insulinabbau vermindert.

ELGEE und WILLIAMS fanden in in vivo-Untersuchungen an der Ratte (22) Hinweise dafür, daß bei Thyreotoxikose Insulin beschleunigt und nach Thyreoidektomie verlangsamt abgebaut wird und erklärten damit zumindest teilweise die Abhängigkeit des Insulinbedarfs des Diabetikers von der Schilddrüsenfunktion in dem Sinne, daß es bei einer Überfunktion der Schilddrüse durch den vermehrten Abbau zu einem relativen Insulinmangel und damit zu einem erhöhten Insulinbedarf kommt.

Aus den vorstehend zitierten Literaturbefunden geht hervor, daß die Leber eine hohe Kapazität zum Insulinabbau besitzt, so daß bereits seit langem die Leber als das wesentlichste Organ für den Insulinabbau betrachtet wird (78, 79, 80). So

bestimmten KAPLAN und MADISON (81), daß von intraportal injiziertem Insulin beim Hund 54 % bei einer Leberpassage verschwinden.

Da die Bestimmungen des Insulinabbaus während der Leberpassage unter in vivo-Bedingungen mit großen methodischen Schwierigkeiten verknüpft ist, wurde von einigen wenigen Arbeitsgruppen die isoliert perfundierte Leber zum Studium des Insulinabbaus benutzt, um unter definierten Versuchsbedingungen den in vivo-Bedingungen möglichst nahe zu kommen.

MORTIMORE et al. (82, 83) zeigten als erste an der isoliert perfundierten Rattenleber, bei kontinuierlicher Perfusion mit Vollblut, daß das dem Medium zugesetzte Jod^{131}-Insulin allmählich verschwand.

STOLL und Mitarbeiter verglichen an der isoliert perfundierten Rattenleber den Abbau von Insulin und Proinsulin (84). Sie zeigten, daß das Insulin schneller abgebaut wird. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch STEINER und Mitarbeiter (85). Da das gesamte von den ß-Zellen sezernierte Insulin über die Pfortader die Leber passieren muß bevor es in den peripheren Kreislauf gelangt, liegt die Annahme nahe, daß die Leber, aufgrund ihrer hohen insulinabbauenden Aktivität, an der Regulation des peripheren Insulinspiegels im Plasma beteiligt ist.

Aufgrund dieser Überlegungen hat man schon in der Frühphase der ß-zytotropen Antidiabetica untersucht, ob man die blutzuckersenkende Wirkung dieser Verbindungen über eine Hemmung des Insulinabbaus in der Leber und damit verknüpft über das erhöhte Insulinangebot in der Peripherie erklären kann. SOLOMON und Mitarbeiter (86) konnten in in vivo und in vitro Untersuchungen am Kaninchen und mit Kaninchenleber keine Beeinflussung des J^{131}-Insulinabbaus durch Carbutamid und Tolbutamid feststellen. In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen von BOLLINGER und GRADY (87) an Diabetikern erwähnenswert, in denen gezeigt wird, daß unter dem Einfluß von

Tolbutamid der Abfall der Plasmakonzentration von intravenös injiziertem J^{131}-Insulin beschleunigt wird.

Im Gegensatz zu den vorstehend genannten beiden Untersuchungen mit Sulfonylharnstoffen fanden MARSHALL und Mitarbeiter an der isoliert perfundierten Rattenleber, daß der Insulinabbau durch die Sulfonylharnstoffe Tolbutamid, Azetohexamid und Tolazamid deutlich vermindert wird (88). Aus diesen Befunden schlossen die Autoren, daß der Blutzucker-senkende Effekt der Sulfonylharnstoffe teilweise durch eine verminderte Aufnahme des Insulins durch die Leber bedingt sei.

Wie bereits oben gesagt wurde, liegt die Annahme nahe, daß die Leber an der Regulation des Insulinspiegels im Plasma beteiligt ist. Man könnte vermuten, daß z.B. bei einem Anstieg der Blutzuckerkonzentration nicht nur die Insulinsekretion der ß-Zellen stimuliert wird, sondern, daß zusätzlich der Abbau des vermehrt sezernierten Insulins in der Leber gehemmt wäre. Unter diesen Bedingungen würde nicht nur, durch das vermehrt zur Leber gelangene Insulin, der Glucose-output der Leber gehemmt, sondern zusätzlich durch das vermehrte Insulinangebot in der Peripherie die Glucose-Utilisation im Muskel und Fettgewebe erhöht. Umgekehrt wäre es biologisch "sinnvoll", wenn bei niedrigen Blutzuckerwerten der Insulinabbau in der Leber erhöht würde,um den Organismus, insbesondere das zentrale Nervensystem, vor einer bedrohlichen Hypoglykämie zu schützen.

Wenn man dieser Hypothese folgt, dann müßte man erwarten, daß bei Zuständen die mit einem niedrigen Blutzuckerspiegel verknüpft sind der Insulinabbau beschleunigt ist. Unter physiologischen Bedingungen ist der Blutzucker im Hungerzustand niedrig, unter pathologischen Bedingungen z.B. bei der Nebennierenrindeninsuffiziens oder bei endokrinen ß-Zelltumoren.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese durch Untersuchungen zum Insulinabbau an der isoliert perfundierten Rattenleber geprüft werden.

2. BESCHREIBUNG DER PRAKTIK

2.1 Reagenzien, Geräte, Tiermaterial, Methoden

R e a g e n z i e n :

Albumin vom Rind, lyophil. rein (Cohn Fr. V)
Serva, Heidelberg

Serum-Albumin vom Rind
Behringwerke AG, Marburg

Calcium-L(+)-Lactat, 21185
Fluka AG, Schweiz

Pyruvat, krist. Mono-Natriumsalz
Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim

α-D Glucose, schwermetallionenfrei
Serva, Heidelberg

Heparin-Natrium, 155.000 I.E./g
Asche & Co. AG, Hamburg

Glukagon, krist., lyophil.
Lilly GmbH, Giessen

Ultralan ®, Fluocortolon
Schering AG, Berlin/Bergkamen

Suprarenin ®, Adrenalin
Hoechst AG, Frankfurt

Rastinon ®, Tolbutamid
Hoechst AG, Frankfurt

Redul ®, Glymidin-Na
Schering AG, Berlin/Bergkamen

Nembutal ®, Pentobarbital-Na
Deutsche Abbott GmbH, Ingelheim am Rhein

Penicillin-G ®, Na-Salz
Hoechst AG, Frankfurt

Aureomycin ®, Chlortetracyclin
Lederle GmbH, München

Streptozotocin ®
Upjohn Comp. Kalamazo, Michigan, USA

Rinder-Insulin, krist. 27 I.E./mg
Hoechst AG, Frankfurt

Depot-Insulin ®, klar, 40 I.E./ml
Hoechst AG, Frankfurt

J^{125}-Insulin, Code IM. 38, 50 µCi/µg
The Radiochemical Centre, Amersham, England

Insulin-Immunoassay Kit, Code IM. 39
Membrane Filter, Code N. 50
The Radiochemical Centre, Amersham, England

Biochemica-Test-Combinationen
f. Blutglucose, GOD-Perid Methode
Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim

UV-Tests f. Pyruvat, Lactat, SGOT, SGPT
Boehringer & Söhne GmbH, Mannheim

Äther, reinst
Hoechst AG, Frankfurt

alle weiteren Lösungsmittel p.a.
Merck, Darmstadt

Human-Erythrozyten, steril
Blutspendedienst d. Virchow-Krankenhauses, Berlin

G e r ä t e :

Photometer "Eppendorf"
Netheler & Hinz GmbH, Hamburg

Zeiss-Spectrophotometer PMQ II

Braun-Systematik zur Blutzuckerbest.
Braun, Melsungen

Autoanalyser ®, Flammenphotometer
Technicon, Chaucney, New York

Kühlzentrifuge Sorvall, RC 2-B
Rotor GSA
Sorvall, Nordwalk, Connecticut, USA

Homogenisator nach Potter-Elvehjem, Modell Potter S
Braun, Melsungen

γ-Counter, Sample changer, Modell 216
Packard, Illinois, USA

T i e r m a t e r i a l :

Männliche Wistar-Ratten, Gewicht 220 - 240 g
Fütterung mit Altromin R, Wasser ad libitum
Medizinische Tier-Züchterei Brünger, 4801 Bockel

M e t h o d e n :

Die Insulinbestimmung wurde mit Hilfe eines Radio-Immunologischen Tests (Insulin-Immunoassay Kit, Fa. The Radiochemical Centre, Amersham) nach der Methode von HALES, C. N. und RANDLE, P. J. (Biochem. J. 88, 137, 1963) durchgeführt. Die Antikörper-gebundene J^{125}-Aktivität wurde im γ-Counter, Packard, gemessen. Die Insulinkonzentrationen der einzelnen Perfusionsproben wurden jeweils anhand einer Standardkurve ermittelt.

Vor der Blutglucosebestimmung wurden die Proben mit Uranylacetat enteiweißt und zentrifugiert. Die Glucosebestimmung erfolgt im eiweißfreien Überstand mit Hilfe eines Farbtests der Firma Boehringer, GOD-Perid-Methode.

Die K^+- und Na^+-Konzentrationen der Perfusionsproben wurden flammenphotometrisch, Autoanalyser, Technicon, bestimmt.

Die Bestimmung der Lactat-, Pyruvat-, GPT- und GOT-Konzentrationen wurde mit Hilfe der Biochemica-Tests der Fa. Boehringer am "Eppendorf"-Photometer durchgeführt.

Die "Aufbereitung" der Human-Erythrozyten wurde in Anlehnung an die von HEMS et al. beschriebene Methode (Biochem. J. 101, 184, 1966) durchgeführt. Zentrifugiert wurde in der Mehrzweck-Zentrifuge, Sorvall, bei 4.000 Upm bzw. 2.611 x g und 4° C, Rotor GSA. Beschreibung der Praktik siehe unter 2.5.2.

Das Hämoglobin wurde als Cyanhämoglobin nach der Methode von BETKE und SAVELSBERG (Biochem. Z. 320, 431, 1950) bestimmt.

Das Leberglykogen wurde nach der Methode von BALZER, H. und PALM, D. (Arch. exp. u. Pharmak. 243, 65, 1962) bestimmt.

2.2 Puffer-Zusammensetzung

Der benutzte Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer wurde nach dem in Tabelle 1 angegebenen Mischungsverhältnis in großen Mengen für das Operations-Medium (OP-Medium), das Vorperfusionsmedium (VP-Medium) und das Hauptperfusionsmedium (HP-Medium) angesetzt. Die $NaHCO_3$-Lösung wurde vor der Zugabe 60 Minuten mit CO_2 begast. Der fertige Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer (KHB-Puffer) wurde steril filtriert und in sterile Infusionsflaschen abgefüllt.

SUBSTANZEN	g/l	Mol/l
NaCl	6,895	0,118
KCl	0,350	0,0047
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,191	0,0013
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,296	0,0012
KH_2PO_4	0,209	0,0012
$NaHCO_3$	2,100	0,025

Tab. 1 : Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffers

Von dem bei 4^o C aufbewahrten Puffer wurde jeweils vor einer Perfusion die notwendige Menge genommen und vor der Zugabe der weiteren Substanzen, siehe Tabelle 2, 15 Minuten mit einem Gemisch aus 95 % O_2 und 5 % CO_2 begast. Das fertige Medium wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

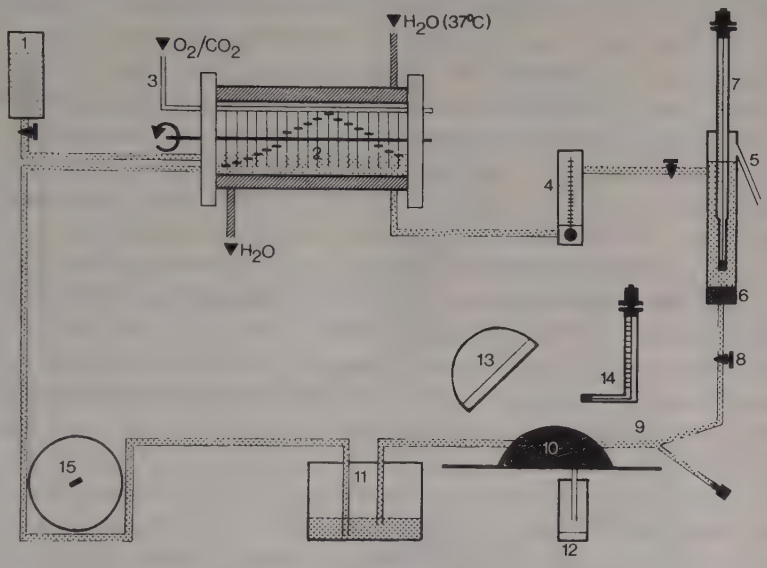
SUBSTANZEN	OPERATIONS-MEDIUM mg %	mmolar	VOR-, HAUPTPERF.-M. mg %	mmolar
Calcium-L(+)-Lactat $C_6H_{10}CaO_6 \cdot 5\ H_2O$	27,1	0,879	27,53	0,893
Natrium-Pyruvat $C_3H_3O_3Na$	2,48	0,225	2,62	0,239
α-D-Glucose $C_6H_{12}O_6$	100,0	5,506	200,0	11,012
Heparin (155.000 I.E./g)	2,5	-	-	-
Rinder-Albumin	-	-	2,5g%	-
Human-Erythrozyten	-	-	2,5g% Hämoglobin	

Tab. 2 : Endkonzentrationen der im Krebs-Henseleit-Bicarbonat-Puffer gelösten Zusatzsubstanzen

Der fertige KHB-Puffer mit den in Tabelle 2 aufgeführten Substanzen wurde in allen nachfolgenden Versuchen als Standardmedium benutzt. Der Zusatz von Human-Erythrozyten war nach Fragestellung verschieden. Genaue Angaben dazu sind in den jeweiligen Versuchsbedingungen aufgeführt.

2.3 Versuchsaufbau

Abb.1 Perfusionsapparatur, schematische Darstellung



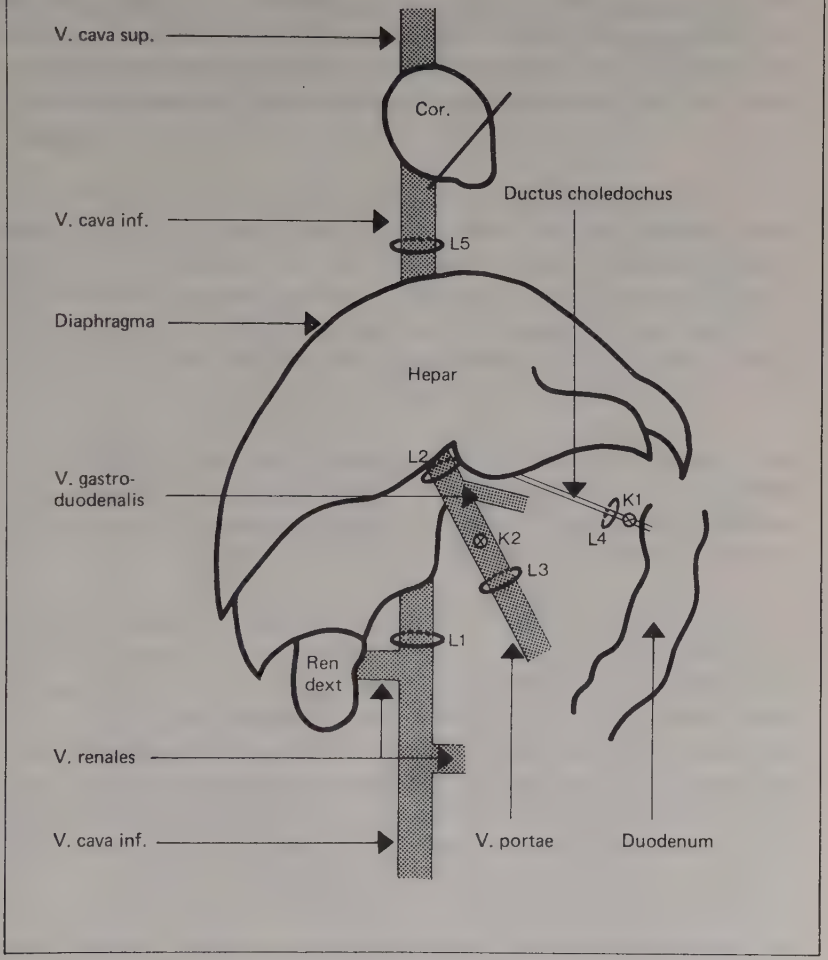
1. Vorratsbehälter
2. Scheibenoxygenator
3. Carbogenzufuhr
4. Durchflußmesser
5. Überlaufgefäß
6. Mullfilter
7. Kontaktthermometer
8. Ventil
9. Pfortaderkatheter
10. Leber
11. Sammelgefäß
12. Meßzylinder
13. Wärmelampe
14. abgebogenes Kontaktthermometer
15. Rollenpumpe

Die Perfusionsapparatur befindet sich in einem allseits geschlossenen Kasten mit Plexiglastüren. Um notwendige Arbeiten während des Versuches (z.B. Probenentnahmen) durchführen zu können, sind in die Türen mehrere verschließbare Öffnungen eingebaut.

Das Perfusionsmedium gelangt vom Vorratsbehälter (1) in einen Scheibenoxygenator (2) - Feinmechanische Werkstatt, Schering AG -. Um ihn herum ist ein mit Wasser gefüllter Wärmemantel angebracht, der das Medium mit Hilfe des Durchflußthermostaten - Fa. Haake, Berlin - konstant auf 37° C temperiert. Das durch die rotierenden Scheiben bewegte Medium wird mit einem Gasgemisch (3) aus 95 % O_2 und 5 % CO_2 versorgt. Damit ist eine optimale Sauerstoffversorgung und Pufferwirkung im Medium erreicht. Aus dem Scheibenoxygenator fließt das Medium in einen Durchflußmesser (4) - Fa. Rota, Oeflingen -, auf dem das gewünschte Volumen in ml/Std. ablesbar ist. Das Medium fließt weiter in ein Überlaufgefäß (5) und weiter durch einen Mullfilter (6) und über ein Ventil (8) in den Pfortader-Katheter (9). Der Flüssigkeitsspiegel im Überlaufgefäß (5) wird so eingestellt, daß er sich ca. 20 cm über dem Leberniveau befindet. Damit ist der notwendige venöse Vordruck erreicht. Durch das im Überlaufgefäß hängende Kontaktthermometer (7) wird nochmals die Temperatur des Mediums überwacht. Nach dem Durchströmen der Leber (10) tropft das Perfusionsmedium in ein Sammelgefäß (11). Die Galle wird in einem Meßzylinder (12) aufgefangen. Die Temperatur über dem Leberpräparat (10) wird mit Hilfe einer Wärmelampe (13) und einem Kontaktthermometer (14) auf 37° C gehalten. Während der Vor-Perfusion und bei kontinuierlicher Leberperfusion (Recycling) wird mit Hilfe einer Rollenpumpe (15) das Medium direkt in den Oxygenator (2) zurückgepumpt.

2.4 Operationsablauf

Abb. 2 Operationssitus, schematische Darstellung



Die Operationstechnik sowie der Operationsablauf wurden annähernd, wie von MILLER (89) beschrieben, durchgeführt. Der Operationssitus ist in Abbildung 2 schematisch und in Abbildung 3 fotografisch wiedergegeben.

Männliche Wistar-Ratten (220 - 240 g) wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 50 mg Nembutal/kg Körpergewicht narkotisiert. Nach ca. 5 Minuten wurde das Abdomen rechts und links bis zu den unteren Rippenbögen durchtrennt. Die Därme wurden zur Seite geschoben, um die Vena portae, die Vena cava inferior und den Ductus cholodochus freizulegen.

Die erste lockere Ligatur (L_1) wurde um die Vena cava inferior oberhalb beider Nierenabzweigungen gelegt. Zwei weitere lockere Ligaturen wurden um die Vena portae gelegt, wobei die obere Ligatur (L_2) direkt unterhalb des Leberhilus oberhalb der Vena gastroduodenalis lag und die andere (L_3) ca. 1 cm distal davon, so daß später zwischen beiden bequem ein Katheter in die Pfortader eingeführt werden konnte.

Nach Incision des Ductus cholodochus unterhalb seiner Einmündung in das Duodenum konnte eine Gallenfistel (K_1/L_4) angelegt werden, um während der Perfusion einen freien, quantitativ kontrollierbaren Gallenfluß zu bekommen.

Durch Anheben der oberen Pfortaderligatur (L_2) wurde der Blutfluß zur Leber gestaut. Zur gleichen Zeit wurde die untere Pfortaderligatur (L_3) geschlossen. In die so gestaute Vena portae konnte mit Hilfe eines kleinen Schnittes ein Katheter (K_2)eingeführt werden. Aus diesem Katheter tropfte während der gesamten, vorangegangenen Operationszeit das O_2/CO_2 begaste Operations-Medium, um den Katheter luftblasenfrei zu halten. Der Katheter (K_2) wurde bis zum Leberhilus vorgeschoben und mit der oberen Ligatur (L_2) fixiert.

Mit wenigen Schnitten wurde der Thorax geöffnet, wobei darauf zu achten war, daß die unteren Rippenbögen mit dem unverletzten

Zwerchfell stehen blieben. Die Herzspitze wurde abgeschnitten und ein Katheter durch das Atrium dextrum in die Vena cava inferior eingeführt und eingebunden (L_5). So konnte das die Leber durchströmende Operationsmedium frei ablaufen.

Zuletzt wurde nur noch die noch offene erste Ligatur (L_1) geschlossen, um einen möglichen Rückfluß zu verhindern. Die Operationszeit durfte maximal 5 Minuten betragen. Die Leberversorgung war keine 20 Sekunden unterbrochen.

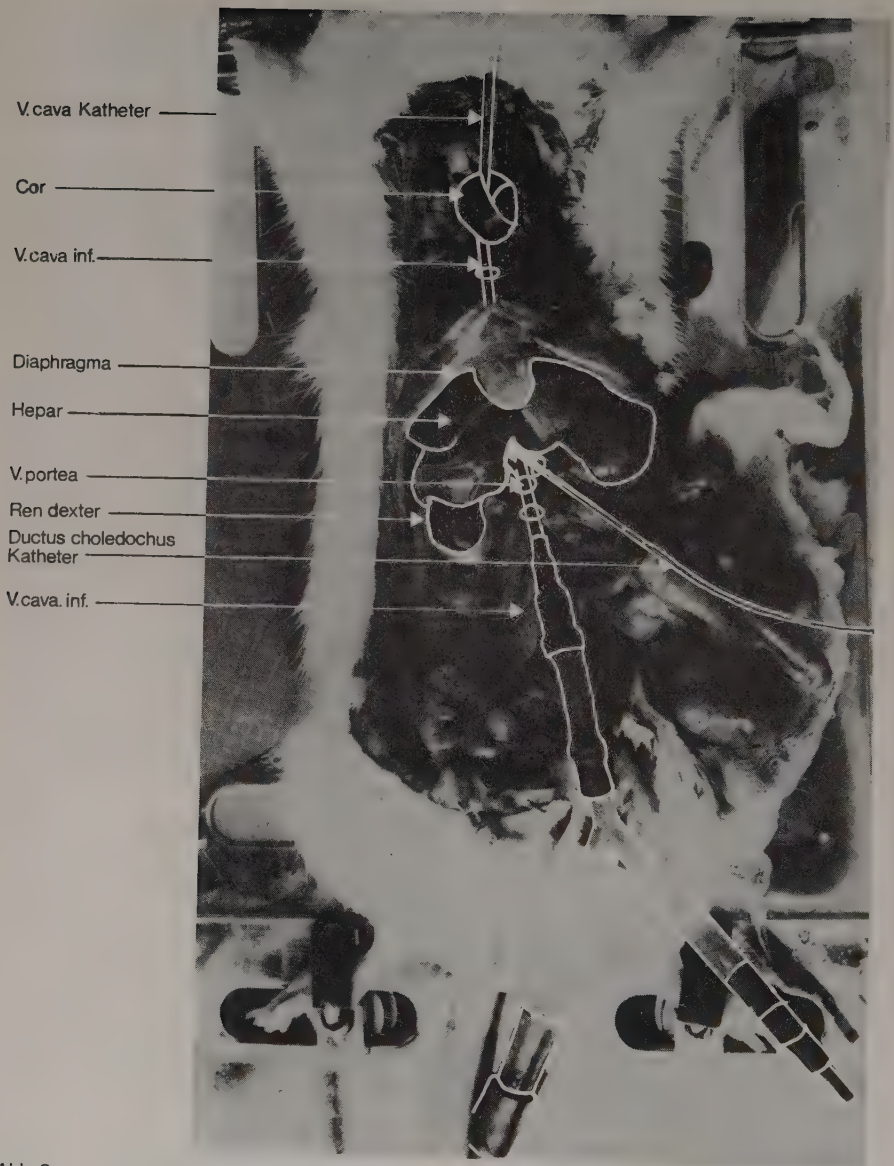


Abb. 3 Fotografische Darstellung des Operationssitus

2.5 Versuchsablauf

2.5.1 Tier-Vorbehandlung

Die im Ergebnisteil zusammengefaßten Leberperfusionsversuche sind nach Fragestellung unterschiedlich mit nachfolgenden Abkürzungen, siehe links, gekennzeichnet. Die nachstehenden Abkürzungen leiten sich von der jeweiligen Tiervorbehandlung ab.

N: 24 Std. nüchterne, intakte Ratten, Wasser ad libitum

Gef: gefütterte, unbehandelte Ratten, Fütterung mit Altromin R, Wasser ad libitum

96^{h}: 96 Std. nüchterne Ratten, Wasser ad libitum, 48 Std. vor Versuchsbeginn auf Stoffwechselkäfige, um jegliche Aufnahme von Spreu und Fäzes zu verhindern

Diab: diabetische Ratten, 24 Std. nüchtern, Wasser ad libitum. 12 Tage vor Versuchsbeginn wurde den Ratten 80 mg Streptozotocin/kg Tiergewicht i.v. injiziert. Vom dritten bis einschließlich zehnten Tag wurden die Ratten mit 4 I.E. Depot-Insulin subcutan substituiert. 24 Std. vor dem Versuchsbeginn wurden die Tiere nüchtern gesetzt. Nur Ratten mit einem Blutglucosegehalt von >250 mg% am Versuchstag wurden in den Versuch genommen.

AE: adrenalektomierte Ratten, 24 Std. nüchtern, 1,0 %ige NaCl-Lösung ad libitum. 5 Tage vor Versuchsbeginn wurden den Ratten operativ die Nebennieren entfernt. Vor der Perfusion, während der Operation, wurde das einwandfreie Entfernen der Nebennieren überprüft.

AE-F: adrenalektomierte Ratten, Vorbehandlung wie unter AE beschrieben. 5 Tage lang wurde den Tieren 1 x täglich 0,2 mg Fluocortolon subcutan verabreicht. Die Substitution begann am Operationstag und endete am Perfusionstag.

AE-FS: adrenalektomierte Ratten, Vorbehandlung siehe unter AE. Die Ratten wurden 1 x täglich mit 0,2 mg Fluocortolon sowie 2 x täglich mit 0,15 mg Suprarenin subcutan substituiert.

HE: hypophysektomierte Ratten, 24 Std. nüchtern, Wasser sowie eine 2 %ige Glucose-Lösung ad libitum. Den Tieren wurde 5 Tage vor der Perfusion die Hypophyse operativ entfernt. *)

2.5.2 "Aufbereitung" der Human-Erythrozyten

Es wurden plasmafreie Blutkonserven verwendet, die etwa 4 Wochen alt waren. Zum Aufbereiten wurde eine 0,9 %ige NaCl-Lösung hergestellt und 15 Minuten mit einem Gemisch aus 95 % O_2 und 5 % CO_2 begast. Die Erythrozyten wurden mit 3-fachem Volumen NaCl-Lösung 10 Minuten gerührt und anschließend in der Kühlzentrifuge bei 4° C und 4.000 Upm 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zentrifugat wurde wiederum mit dem 3-fachen Volumen an NaCl-Lösung aufgefüllt, 10 Minuten gerührt und 20 Minuten zentrifugiert.

Nach dem dritten Aufbereitungsgang wurde die für das Perfusionsmedium benötigte Menge an Erythrozyten im Verhältnis 1 : 1 mit begastem (O_2/CO_2) Krebs-Henseleit-Bicarbonatpuffer und 100 mg% Glucose aufgefüllt und bis zum Versuchsbeginn bei 4° C aufbewahrt. Vor der Perfusion wurde daraus eine Probe zur Hämoglobinbestimmung entnommen. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde die errechnete Menge an Erythrozyten zu dem Perfusionsmedium gegeben. Aus dem fertigen Perfusionsmedium wurde dann nochmals eine Probe entnommen und der wahre Hämoglobinwert ermittelt. Er sollte ca. 2,5 g% betragen.

---

*) Ich danke Herrn Dr. v. Berswordt-Wallrabe, Schering AG Berlin, für die Durchführung der Hypophysektomie.

2.5.3 Vorbereitung der Perfusion

Für eine Leber-Perfusion mußte, wie schon vorstehend erwähnt, ein Operations-Medium (OP-Medium) und ein Perfusions-Medium, bestehend aus einem Vorperfusions- und einem Hauptperfusions-Medium (VP-, HP-Medium), hergestellt werden.

OP-Medium: Siehe auch unter 2.2, Tabelle 2.

Das fertige Operationsmedium wurde vor der Operation in eine Infusionsflasche gefüllt, mit Hilfe einer Kanüle konnte das Medium mit O_2/CO_2 begast werden. Kurz vor der Operation wurde nochmals der Infusionsschlauch auf eventuelle Luftblasen hin kontrolliert, dann wurde eine sehr langsame Tropfgeschwindigkeit eingestellt. So wurde gewährleistet, daß der Katheter luftblasenfrei blieb.

VP- und HP-Medium: Siehe auch unter 2.2, Tabelle 2.

Die beiden Perfusionsmedien wurden zusammen angesetzt. Von dem fertigen Medium wurden 100 ml für die Vorperfusion in die Perfusionsapparatur gegeben. Im Scheibenoxygenator, siehe Versuchsaufbau 2.3, wurde das Vorperfusionsmedium mit O_2/CO_2 begast und auf 37° C temperiert.

Das Hauptperfusionsmedium wurde nach Zugabe der erforderlichen Insulinmenge (nach Fragestellung verschieden) 15 Minuten bei 37° C im Wasserbad gerührt. Erst danach wurde die Probe für die Insulinausgangskonzentration entnommen.

2.5.4 Durchführung der Perfusion

Nach Beendigung der Operation wurde die Leber mit dem gesamten restlichen Tierkörper in den, auf 37° C temperierten, Perfusionskasten gelegt. Nachdem die Leberlappen sichtlich entblutet waren, wurde statt des OP-Mediums, ohne Unterbrechung, mit Hilfe einer an den Pfortaderkatheter angebrachten zweiten Zufuhr die Leber weiter mit dem Vorperfusionsmedium (ohne

Insulin) kontinuierlich (Recycling) durchströmt. Die Vorperfusion dauerte ca. 30 Minuten.

Nachdem die restlichen ml des Vorperfusionsmediums in einem Sammelgefäß aufgefangen wurden und 20 ml Mischphase zwischen dem Vorperfusionsmedium und dem nun nachfolgenden Hauptperfusionsmedium (insulinhaltig) verworfen wurden, begann die Hauptperfusionszeit.

Die Durchflußrate wurde konstant bei 1,2 - 1,4 ml/g/min gehalten. Perfusionsdauer ca. 120 Minuten, eventuelle Abweichungen sind jeweils vermerkt. Die Probenentnahme und die Anordnung sowie die Anzahl der Durchläufe waren nach Fragestellung verschieden.

Diskontinuierliche Perfusion:

Es wurde jeweils das gesamte Volumen einmal durch die Leber geschickt. Nach 5 Minuten, gerechnet vom Beginn eines neuen Durchlaufes, wurde eine Probe (Volumen nach Anzahl der Bestimmungen verschieden) direkt von dem, aus dem Katheter tropfenden, Medium aufgefangen. Vor Beginn eines neuen Durchlaufes wurden jeweils 20 ml Mischphase verworfen.

Kontinuierliche Perfusion (Recycling):

Das Perfusionsmedium wurde nach dem Durchströmen der Leber direkt mit Hilfe einer Rollenpumpe wieder in den Scheibenoxygenator zurückgepumpt. Proben wurden in Zeitintervallen von 5 Minuten entnommen.

Nach Beendigung einer Perfusion wurde die Leber aus dem restlichen Tierkörper herausgetrennt, abgetropft und gewogen. Das Lebergewicht betrug 8 - 10 g. Die gesammelte Menge an Galle wurde gemessen, aber nicht weiter aufgearbeitet.

2.5.5 Aufarbeitung des Mediums

Die entnommenen Perfusionsproben wurden in Zentrifugengläsern im Eisbad aufbewahrt. 0,05 ml von jeder Probe wurde für die Blutglucosebestimmung mit 0,05 ml Uranylacetat zur Enteiweissung versetzt, siehe auch 2.1.4. Für die Pyruvat- und Lactat-Bestimmung wurden 3 ml der Probe mit 3 ml TCA versetzt (Eiweißfällung) und in vorgekühlten Zentrifugenbechern bei 3.000 Upm zentrifugiert. Die Überstände wurden nach Vorschrift der Biochemica Tests, Boehringer, weiter verarbeitet.

Weitere 5 ml einer Probe wurden zentrifugiert bei 3.000 Upm. Vom Überstand ("Serum") wurden die benötigten ml für die SGOT, SGPT, K^+, Na^+ und für die Insulin-Bestimmung entnommen. Die Proben für K^+, Na^+ und Insulin-Bestimmung wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20° C eingefroren. Weiterverarbeitung siehe unter 2.1.4.

3. ERGEBNISSE DER LEBERPERFUSIONSVERSUCHE

3.1 Untersuchungen zur Leberfunktion unter Perfusionsbedingungen

In zahlreichen Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen (89 - 100) wurde die Brauchbarkeit der isoliert perfundierten Rattenleber für Stoffwechseluntersuchungen nachgewiesen. Zur Überprüfung des eigenen Modells wurden einige orientierende Versuche zur Funktion der perfundierten Leber durchgeführt. Dabei wurden folgende Meßgrößen im Perfusionsmedium benutzt:

Glucose-Konzentration
Lactat-Konzentration
Pyruvat-Konzentration
Na^+- und K^+-Konzentration
GOT- und GPT-Konzentration
Galle (Volumen am Ende der Perfusionszeit)

> der sich daraus ergebene L/P-Quotient

3.1.1 Zur Frage der Sauerstoffversorgung der Leber

Zum Nachweis der Bedeutung der Erythrozyten im Perfusionsmedium zur Gewährleistung der Sauerstoffversorgung der Leber und zum Nachweis der Bedeutung der Sauerstoffversorgung der Leber für ihre Funktion wurden einige Untersuchungen mit Erythrozyten-freiem Medium durchgeführt.

3.1.1.1 Leberperfusionen mit Erythrozyten-freiem Medium

Versuchsbedingungen:
Leber-Perfusion mit Standardmedium, siehe unter 2.2, Tabelle 2, ohne Erythrozyten im Medium. Perfusionsdurchführung siehe unter 2.

Meßgrößen: Glucose
Lactat
Pyruvat
GOT, GPT
K^+, Na^+

Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tab.3

Probe	Glucose mg%	Glucose µMol/l	Lactat µMol/l	Pyruvat µMol/l	L/P	GOT mE/ml	GPT mE/ml	K^+ µVal/l	Na^+ µVal/l
Versuch 1									
Vorperf.									
AM	183	10180	1550	285	5	3,1	2,7	6,4	172,(
EM	200	11111	1522	46	34	9,0	2,2	7,4	180,5
Hauptperf.									
AM	186	10320	1438	287	5	3,6	1,3	6,3	159,0
1.DL	190	10550	1775	50	36	12,1	3,1	5,9	122,5
2."	184	10220	1905	56	34	235,2	61,8	8,1	135,1
3."	189	10500	2045	76	27	206,1	50,6	8,1	143,1
4."	185	10290	2115	82	26	213,7	50,6	8,3	150,5
5."	188	10450	2270	86	27	254,2	66,8	8,8	141,8
6."	184	10220	2285	85	27	277,3	74,4	9,1	141,8
Versuch 2									
Vorperf.									
AM	188	10450	1422	252	6	4,5	1,8	6,3	143,1
EM	212	11780	1240	65	19	5,8	1,8	6,4	145,1
Hauptperf.									
AM	202	11210	1395	251	6	4,5	1,8	6,3	136,4
1.DL	202	11210	1422	93	15	5,4	1,3	6,4	145,2
2."	198	11000	1520	105	15	13,0	4,5	6,5	145,2
3."	196	10320	1580	134	12	34,5	17,9	6,8	143,(
4."	198	11000	1665	155	11	65,9	34,5	7,0	140,0
5."	198	11000	1720	138	13	84,2	40,3	7,6	136,3
6."	202	11210	1720	122	14	107,1	48,4	7,6	146,3

Meßergebnisse aus 2 Leberperfusionsversuchen ohne Zusatz von Erythrozyten im Perfusionsmedium.

AM: Ausgangsmedium, EM: Endmedium, DL: Durchlauf

Aus der Tabelle 3 folgt, daß die Glucosekonzentration während der gesamten Perfusionszeit konstant blieb. Die Lactatkonzentration nahm während der Hauptperfusion gegenüber dem Ausgangswert (AM: Ausgangsmedium) kontinuierlich zu. Nach dem 6. Durchlauf stieg die Lactatkonzentration im ersten Versuch von 1.400 auf 2.300 µMol/l und im zweiten Perfusionsversuch

von ca. 1.400 auf 1.700 µMol/l an. Dieses entspricht einem Anstieg um ca. 60 % bzw. 40 % der Ausgangskonzentration. Die Pyruvatkonzentration fiel in der Hauptperfusion nach dem ersten Durchlauf (DL) bereits auf 50 bzw. 100 µMol/l, dieses entspricht einem Abfall auf ca. 20 bzw. 40 % der Pyruvat-Ausgangskonzentration. Bei fortschreitender Perfusion stieg das Pyruvat nur geringfügig wieder an.

Der L/P-Quotient stellte sich in der Hauptperfusion bereits nach dem ersten Durchlauf auf einen Wert von ca. 30 im ersten Versuch bzw. auf einen Wert von 15 im zweiten Versuch ein.

Die Transaminasen GOT und GPT zeigten im Verlauf der Hauptperfusion gegenüber den unspezifischen Leerwerten im Ausgangsmedium in beiden Versuchen einen starken Anstieg, der bei der Transaminase GOT besonders ausgeprägt war.

Im Gegensatz zu den Transaminasewerten zeigten die K^+-Werte in beiden Versuchen nur einen geringfügigen Anstieg, wogegen die Na^+-Konzentrationen weitgehend unverändert blieben.

Nach den Untersuchungen von SCHIMASSEK (93) beträgt der Lactat/Pyruvat-Quotient in der Leber in vivo etwa 10. Auch im Perfusionsmedium der isoliert perfundierten Rattenleber stellt sich nach SCHIMASSEK ein L/P-Quotient von 10 ein. Da der L/P-Quotient eine empfindliche Meßgröße für das Redox-System in der Leber darstellt, zeigen nach SCHIMASSEK Quotienten um und über 20 einen erhöhten Hydrierungsgrad der isolierten Leber an und damit eine Abweichung vom normalen Status.

In den oben aufgeführten Versuchen mit Erythrozyten-freiem Perfusionsmedium deuten auch die ausgeprägten Transaminaseanstiege im Perfusionsmedium auf eine erhebliche Beeinträchtigung der Leberfunktion hin.

Die folgenden Leberperfusionsversuche sprechen dafür, daß diese Leberfunktionsstörung in den beiden oben aufgeführten

Versuchen auf eine mangelhafte Sauerstoffversorgung der Leber zurückgeführt werden kann.

3.1.1.2 Leberperfusionen mit Erythrozyten-haltigem Medium

In den folgenden Perfusionsversuchen wurde die Leber mit Erythrozyten-haltigem Medium perfundiert. Es wurden bewußt im Ausgangsmedium verschiedene Lactat- und Pyruvat-Konzentrationen eingesetzt, um die Fähigkeit der mit Erythrozyten-haltigem Medium perfundierten Leber zu prüfen, dem physiologischen Redox-Zustand entsprechend, einen L/P-Quotient im Medium von etwa 10 wieder einzustellen.

Versuchsbedingungen:
Wie unter 3.1.1.1 beschrieben, nur wurde mit Erythrozyten-haltigem Medium perfundiert. Die Na^+ Konzentration wurde nicht mitbestimmt. Die Versuchsergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengefaßt.

Meßgrößen:
- Glucose
- Lactat
- Pyruvat
- GOT, GPT
- K^+

Tab. 4

Probe	Glucose mg%	Glucose µMol/l	Lactat µMol/l	Pyruvat µMol/l	L/P	GOT mE/ml	GPT mE/ml	K^+ µVal/l
Versuch 3								
Hauptperf.								
AM	132	7330	5375	530	10	1,8	0,9	5,4
1.DL	153	8500	2845	375	8	1,8	1,3	5,5
2."	156	8660	2340	401	6	2,2	1,3	5,7
3."	160	8900	1925	423	5	2,5	1,7	6,2
4."	161	8940	1825	466	4	2,7	2,2	6,4
5."	163	9060	1685	427	4	3,5	2,7	6,5
6."	161	8950	1635	339	5	8,6	2,9	6,4
7."	159	8840	2085	295	7	11,2	3,1	6,2
8."	159	8840	2115	253	8	13,1	4,2	6,5
9."	156	8660	2000	213	9	15,6	4,6	6,9
Versuch 4								
Hauptperf.								
AM	198	11000	3430	19	190	2,2	2,2	5,7
1.DL	212	11800	1890	68	28	3,6	2,7	5,9
2."	202	11200	1665	175	10	3,1	2,7	6,2
3."	224	12450	1800	226	8	4,0	3,7	6,3
4."	183	10200	2000	227	9	8,6	4,5	6,5
5."	211	11700	2155	253	8	11,7	4,9	6,7
6."	208	11550	2370	249	10	15,2	5,4	6,6
7."	199	11060	2630	245	11	17,8	6,7	6,7
Versuch 5								
Hauptperf.								
AM	233	12960	1638	154	10	2,2	1,8	4,9
1.DL	225	12500	1870	171	11	3,8	2,2	5,5
2."	215	11940	2260	211	11	5,6	2,2	5,3
3."	204	11330	2470	218	11	7,2	3,1	5,1
4."	198	11000	2440	191	12	9,7	3,6	5,5
5."	200	11110	2335	175	13	13,5	4,0	4,9
6."	196	10890	2215	158	13	15,7	5,8	5,9
7."	199	11050	2335	146	16	18,0	7,4	5,5
8."	197	10950	1910	142	13	18,6	7,8	5,5
9."	191	10610	1770	126	14	25,1	8,3	5,5

Meßergebnisse von 3 Leberperfusionsversuchen unter Zusatz von Erythrozyten im Perfusionsmedium

AM: Ausgangsmedium, DL: Durchlauf

Aus den in Tabelle 4 wiedergegebenen Ergebnissen geht hervor, daß die mit Erythrozyten-haltigem Medium perfundierte Leber in der Lage ist, trotz stark unterschiedlicher Lactat- und Pyruvat-Konzentration im Ausgangsmedium, den physiologischen L/P-Quotienten von ca. 10 rasch einzustellen und auch über eine

längere Perfusionszeit aufrecht zu erhalten. Selbst bei einer sehr niedrigen Pyruvat-Ausgangskonzentration von nur 20 µMol/l im Versuch 4 und einem entsprechend hohem L/P-Quotienten ist bereits nach dem 2. Durchlauf der L/P-Quotient normalisiert.

Da nach SCHIMASSEK der L/P-Quotient im Perfusionsmedium den L/P-Quotienten im Lebergewebe spiegelt, kann man aus den beschriebenen, orientierenden Versuchen ableiten, daß in der mit Erythrozyten-haltigem Medium perfundierten Leber der physiologische Redox-Zustand vorhanden ist.

Die Bedeutung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung für die Funktion der isoliert perfundierten Leber geht auch aus dem Versuch 5 hervor, in dem die Transaminasen GOT und GPT nur sehr geringfügig während der gesamten Perfusionsdauer (ca. 180 Minuten) ansteigen.

In allen Versuchen mit Erythrozyten-haltigem Medium wurde wie in der Methodik, unter 2.5.2, beschrieben mit ca. 4 Wochen alten Erythrozyten aus Humanblutkonserven gearbeitet, von denen bekannt ist, daß ihre Stoffwechselaktivität bei Erhalt der Sauerstofftransportfunktion sehr weit reduziert ist.

3.1.1.3 "Leer-Perfusionsversuch" mit Erythrozyten-haltigem Medium

Um nachzuweisen, daß die hier verwendeten, gealterten Erythrozyten nicht in beträchtlichem Umfange am Lactat-, Pyruvat-Umsatz beteiligt sind, wurde unter den vorstehend beschriebenen allgemeinen Perfusionsbedingungen gearbeitet, ohne jedoch das Perfusionsmedium durch eine Leber zu schicken ("Leer-Perfusion").

Versuchsbedingungen:
"Leer-Perfusion": gleiche Perfusionsbedingungen wie unter 3.1.1.1, nur ohne Zwischenschaltung einer Leber. Keine Vorperfusion.

Meßgrößen: Glucose
Lactat
Pyruvat
GOT, GPT
K^+

Die Meßergebnisse von 2 "Leer-Perfusionen" mit verschiedenen Erythrozyten-Chargen sind in der Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tab. 5

Probe	Glucose mg%	Glucose µMol/l	Lactat µMol/l	Pyruvat µMol/l	L/P	GOT mE/ml	GPT mE/ml	K^+ µVal/l
Versuch 6								
"Leerperf."								
AM	212	11780	1824	227	8	4,5	3,6	6,6
1.DL	206	11450	1796	212	8	2,2	2,6	6,7
2."	211	11720	1819	211	9	4,0	2,2	7,5
3."	208	11560	1834	195	9	4,0	1,3	8,4
4."	209	11610	1816	179	10	4,0	2,2	8,4
5."	209	11610	1824	220	8	3,6	2,2	8,9
6."	209	11610	1796	193	9	4,9	2,7	9,0
7."	208	11550	1869	193	10	4,9	2,2	8,7
8."	208	11550	1812	212	9	4,9	2,3	8,7
9."	203	11280	1848	210	9	5,4	2,2	8,5
Versuch 7								
"Leerperf."								
AM	218	12110	2045	169	12	3,6	1,3	6,2
1.DL	219	12160	2110	163	12	2,7	0,4	6,2
2."	217	12050	2080	160	13	2,7	2,7	6,4
3."	224	12440	2090	164	12	3,1	1,3	6,3
4."	211	11730	2100	144	14	3,6	0,9	6,2
5."	215	11950	2230	142	15	3,6	0,9	6,4
6."	214	11890	2140	134	15	3,6	1,1	6,5
7."	212	11770	2240	124	18	4,9	1,3	6,5
8."	216	12000	2230	112	19	4,0	2,2	6,5

Meßergebnisse von 2 "Leer-Perfusionen" mit Erythrozyten-haltigem Medium (verschiedene Chargen).

Bei dem, in Tabelle 5 wiedergegebenen Versuch 6, waren die Lactat- und Pyruvat-Konzentrationen und entsprechend der L/P-Quotient über die gesamte Perfusionszeit unverändert. Im Gegensatz dazu nahm im Versuch 7, der zweiten "Leer-Perfusion", die Lactatkonzentration im Medium geringfügig zu und die Pyruvatkonzentration geringfügig ab. Der L/P-Quotient nahm ent-

sprechend zu. Letztere Versuchsergebnisse zeigen, daß die in der Perfusion benutzten gealterten Erythrozyten möglicherweise noch eine sehr geringe Stoffwechselaktivität besaßen.

Da die oben beschriebenen Versuchsergebnisse zeigten, daß die mit Erythrozyten-haltigem Medium perfundierte Rattenleber auch bei extrem unterschiedlichem Lactat-, Pyruvat-Angebot den physiologischen L/P-Quotienten von ca. 10 einzustellen vermag, kann man ausschließen, daß die möglicherweise durch die Erythrozyten bedingten geringen Änderungen der Lactat-, Pyruvat-Konzentrationen einen Einfluß auf den Redox-Zustand erheben.

Nachdem die Untersuchungen zur Biochemie und Membranpermeabilität der Leberzelle unter Perfusionsbedingungen den Nachweis erbracht hatten, daß sie mit den oben angeführten Literaturbefunden übereinstimmten, konnte zur eigentlichen Fragestellung der vorliegenden Arbeit übergegangen werden.

Dazu war aber unbedingt notwendig, mit Hilfe der "Leer-Perfusion" das Erythrozyten-haltige Medium auf die Insulin-Stabilität hin zu prüfen.

3.1.2 Überprüfung der Insulin-Stabilität im Erythrozyten-haltigen Medium

Um eventuelle Einflüsse der Erythrozyten auf das Insulin auszuschließen, wurden vergleichende "Leer-Perfusionen" ohne Zusatz von Erythrozyten parallel zu den "Leer-Perfusionen" unter Zusatz von Erythrozyten durchgeführt.

Versuchsbedingungen:
"Leer-Perfusionen": allgemeine, standardisierte Perfusionsbedingungen, jedoch ohne Zwischenschaltung einer Leber. Keine Vorperfusion.

Meßgrößen: Glucose
Lactat
Pyruvat
Insulin

Die Ergebnisse beider "Leer-Perfusionen", Versuch 8 ohne Erythrozyten und Versuch 9 mit Erythrozyten-haltigem Medium, sind in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Tab. 6

Probe	Glucose mg%	Glucose µMol/l	Lactat µMol/l	Pyruvat µMol/l	L/P	Insulin µE/ml	Insulin x10^{-3} µMol/l
Versuch 8							
"Leerperf."							
AM	195	10820	1692	240	7	360	2,07
1.DL	191	10600	1720	258	7	370	2,13
2.DL	193	10660	1720	262	6	370	2,13
3.DL	195	10820	1692	264	6	340	1,95
4.DL	196	10880	1720	257	7	360	2,07
5.DL	188	10440	1747	259	7	300	1,73
6.DL	188	10440	1705	260	7	300	1,73
7.DL	191	10610	1720	269	6	370	2,13
8.DL	196	10880	1762	245	7	350	2,01
9.DL	199	11050	1762	256	7	320	1,84
Versuch 9							
"Leerperf."							
AM	218	12110	1840	161	11	360	2,07
1.DL	217	12010	1860	154	12	356	2,05
2.DL	212	11780	1827	148	12	420	2,42
3.DL	214	11880	1867	144	13	365	2,10
4.DL	214	11880	1948	143	13	355	2,04
5.DL	215	11950	2105	239	9	355	2,04
6.DL	212	11780	1980	236	8	360	2,07
7.DL	212	11780	2300	236	10	330	1,89
8.DL	210	11670	2215	238	9	360	2,07
9.DL	217	12010	2080	224	9	355	2,04

Meßergebnisse von 2 "Leer-Perfusionen", Versuch 8 ohne Erythrozyten, Versuch 9 mit Erythrozyten-haltigem Medium

Aus der Tabelle 6 ist zu ersehen, daß die Insulinmeßergebnisse sich nach oben und nach unten um einen Mittelwert bewegen, der ungefähr dem Wert der Insulin-Ausgangskonzentration entspricht. Diese Abweichungen liegen wahrscheinlich im

Fehlerbereich der immunologischen Insulinbestimmung, da ein Anstieg der Insulinkonzentration im "Leer"-Perfusionsmedium nicht möglich ist. Da die jeweiligen Insulinausgangs- und Insulinend-Konzentrationen in den beiden "Leer"-Perfusionsversuchen fast identisch sind, kann davon ausgegangen werden, daß das ausgetestete Perfusionsmedium auch unter dem Zusatz von Erythrozyten keinen Einfluß auf das Insulin hat.

Im Versuch 8 liegt der L/P-Quotient fast konstant bei 7, entsprechend sind die Lactat- und Pyruvat-Konzentrationen kaum verändert. Im Versuch 9 schwankt der L/P-Quotient zwischen 13 und 9.

Mit der Gewißheit, daß das Insulin während einer "Leer-Perfusion" nicht abgebaut wird, konnte zu der letzten noch offenstehenden Frage übergegangen werden.

3.1.3 Prüfung der Insulinstabilität in Gegenwart eines Antibioticums im Perfusionsmedium

Die Frage der Keimfreiheit im Perfusionsmedium über eine Perfusionsdauer von 120 bis 240 Minuten wird von den einzelnen Arbeitsgruppen verschieden gelöst. Ausgehend von der Tatsache, daß in diesem Rahmen kaum eine Leberperfusion unter völlig sterilen Bedingungen durchgeführt werden kann, kann man aber das Keimwachstum hemmen. Die Perfusionsapparatur (Schlauchmaterial) kann z.B. vor dem Perfusionsversuch (94) mit 0,5 %igem Formaldehyd desinfiziert und mit steriler physiologischer NaCl-Lösung reichlich nachgespült werden. Dem Perfusionsmedium kann ein Antibioticum zugesetzt werden. So verwendete z.B. SCHIMASSEK (94) im Perfusionsmedium das Antibioticum Terramycin. Da dieses nicht zugänglich war, mußte ein anderes Antibioticum verwendet werden. Aureomycin, das auch zu der Gruppe der Tetracycline gehört, schien dafür geeignet zu sein.

3.1.3.1 Inkubationsversuche mit Aureomycin

Zur Überprüfung der Insulin-Stabilität in Gegenwart von Aureomycin im Medium wurden folgende Inkubationsversuche durchgeführt:

Versuchsbedingungen:

Die Versuchsmedien wurden im Scheibenoxygenator (siehe Versuchsapparatur, Abbildung 1) bei 37° C gerührt und mit 95 % O_2 / 5 % CO_2 begast. Probenentnahme alle 20 Minuten.

Medium: 100 ml Krebs-Henseleit-Bicarbonat Puffer (steril)
+ ca. 700 µE Insulin/ml
+ 2,0 mg % Aureomycin, Versuch 10
+ 20,0 mg % Aureomycin, Versuch 11 und 12

Meßwerte: Insulin
Die Insulinmeßergebnisse der drei Inkubationsversuche sind in der Tabelle 7 zusammengefaßt.

Tab. 7

Probe (min)	Versuch 10 Insulinkonz. µE/ml	Versuch 10 Insulinkonz. x10^{-3}µMol/l	Versuch 11 Insulinkonz. µE/ml	Versuch 11 Insulinkonz. x10^{-3}µMol/l	Versuch 12 Insulinkonz. µE/ml	Versuch 12 Insulinkonz. x10^{-3}µMol/l
0	740	4,56	850	5,24	750	4,62
20	560	3,45	560	3,45	650	4,01
40	450	2,77	470	2,90	585	3,61
60	410	2,53	410	2,53	550	3,39
80	350	2,16	200	1,23	470	2,90
100	320	1,97	90	0,55	315	1,94
120	300	1,85	70	0,43	295	1,82

Insulinmeßergebnisse aus 3 Inkubationsversuchen

Die in Tabelle 7 aufgeführten Insulinmeßwerte aus den Versuchen 10, 11 und 12 zeigen deutlich, daß während einer Inkubationsdauer von 120 Minuten das Insulin verschwindet bzw. immunologisch nicht mehr nachweisbar war. Unter dem Zusatz von 2,0 mg Aureomycin in 100 ml KHB-Puffer im Versuch 10 sind nach 120 Minuten nur noch 40 % der Insulinausgangskonzentration vorhanden. Bei einer höheren Aureomycin-Konzentration von 20,0 mg Aureomycin pro 100 ml KHB-Puffer sind im Versuch 11 noch 8 % und im Versuch 12 noch 39 % der Insulinausgangskonzentration vorhanden. Ein möglicher Einfluß auf den Insulinschwund, der abhängig von der Aureomycin-Konzentration ist, deutete sich nur in Versuch 11, aber nicht in Versuch 12 an.

3.1.3.2 Inkubationsversuche mit Aureomycin unter verschiedener Begasung

Um diese oben beschriebenen interessanten Versuchsergebnisse zu bestätigen bzw. zu ergänzen, wurden weitere Inkubationsversuche mit Aureomycin im Insulin-haltigen Medium unter unterschiedlicher Begasung durchgeführt.

Versuchsbedingungen:

Medium: 100 ml KHB-Puffer
+ ca. 700 µE Insulin/ml
+ 2,0 mg Aureomycin/100 ml

Meßwerte: Insulin

Begasung: Versuch 13 mit 95 % O_2 und 5 % CO_2
Versuch 14 mit N_2 (Lampenstickstoff, Pyrogalol)
Versuch 15 mit 100 %igem CO_2
Versuch 16 keine Begasung
Versuch 17 keine Begasung

Die Meßergebnisse der oben erläuterten Inkubationsversuche mit Aureomycin sind in der Tabelle 8 zusammengefaßt.

Versuchsanordnung:

Die Inkubationsmedien befanden sich in allen fünf Versuchen jeweils in einem Becherglas, das in einem auf 37° C temperierten Wasserbad stand. Die Medien wurden während der Versuchszeit nicht gerührt, nur nach Fragestellung verschieden begast. Probenentnahmen alle 20 Minuten.

Tab.8

Probe (min)	Versuch 13 Beg.(O_2/CO_2) Insulinkonz.		Versuch 14 Beg.(N_2) Insulinkonz.		Versuch 15 Beg.(CO_2) Insulinkonz.		Versuch 16 Beg. keine Insulinkonz.		Versuch 17 Beg. keine Insulinkonz.	
	µE/ml	nMol/l	µE/ml	nMol/l	µE/ml	nMol/l	µE/ml	nMol/l	µE/ml	nMol/l
0	745	4,59	645	3,98	685	4,22	775	4,78	730	4,50
20	435	2,68	640	3,95	660	4,07	755	4,66	660	4,07
40	415	2,56	515	3,17	645	3,98	730	4,50	640	3,95
60	310	1,91	450	2,77	630	3,88	695	4,29	625	3,85
80	260	1,60	305	1,88	625	3,85	650	4,01	620	3,82
100	250	1,56	300	1,85	610	3,76	630	3,88	600	3,70
120	110	0,67	250	1,54	605	3,73	590	3,64	550	3,39

Insulinmeßergebnisse von 5 Inkubationsversuchen

Die Versuchsergebnisse in Tabelle 8 zeigen, daß bei unterschiedlicher Begasung die Stärke des Insulinschwundes deutlich verschieden ist.

Wird das stehende Medium, wie in Versuch 13, mit einem Gasgemisch aus 95 % O_2 / 5 % CO_2 begast, sind nach 120 Minuten nur noch ca. 15 % der Insulinausgangskonzentration wiederzufinden. Im Versuch 14 unter N_2-Begasung verschwinden von dem eingesetzten Insulin 61 %,d. h. 39 % der Insulinanfangskonzentration konnten nur noch immunologisch nachgewiesen werden. Im Versuch 15 wurde das Medium mit CO_2 begast. Am Ende der Inkubationszeit waren noch 88 % der Insulinausgangskonzentration nachzuweisen. Der Insulinschwund in den drei oben aufgeführten Versuchen verhält sich wie 85 % : 61 % : 12 % oder 7 : 5 : 1.

Die Inkubationsmedien in Versuch 16 und 17 wurden nicht begast, auch unter dieser Versuchsanordnung kann in beiden Inkubationen ein Insulinschwund von ca. 25 % beobachtet werden.

Interessant ist es noch zu erwähnen, daß die Versuchsmedien bei O_2 / CO_2-Begasung unter Bildung eines leichten Niederschlages sich während der Inkubationsdauer entfärbten. Der pH-Wert blieb bei 7,4. Unter N_2-Begasung trübte sich das Medium milchig, kein Niederschlag, keine Änderung des pH-Wertes. Bei CO_2-Begasung blieb das Medium wie unter "Nicht-Begasung" klar, keine Entfärbung, aber Änderung des pH-Wertes auf ca. 6,3.

Da das Insulin scheinbar mit Aureomycin präzipitiert wird, wurden Inkubationsversuche mit J^{125}-markiertem Insulin durchgeführt. Am Ende der Inkubation nach 120 Minuten wurden die entnommenen Proben zentrifugiert und der Überstand im γ-counter gemessen.

Unter O_2/CO_2-Begasung verschwanden 72 % und unter N_2-Begasung 41 % der gemessenen Insulinausgangswerte. Diese Meßwerte bestätigten die oben gefundenen Insulinschwunde und zeigen, daß das Insulin durch Präzipitation inaktiviert wurde, d.h. mit Hilfe der immunologischen Insulinbestimmung nicht mehr nachweisbar war.

3.1.3.3 "Leer-Perfusionen" mit Aureomycin-haltigem Medium

Zur Sicherung dieser interessanten Befunde wurden noch weitere Untersuchungen durchgeführt. Die Meßergebnisse von drei "Leer-Perfusionen" sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Versuchsbedingungen:

"Leer-Perfusion":	Perfusion ohne Organ, sonst gleiche Versuchsanordnung.
Medium:	Standardmedium siehe unter 2.2

+ Erythrozyten
+ Insulin verschiedener Konzentrationen
+ Aureomycin 20,0 mg/120 ml Endvolumen

Meßwerte: Glucose
Lactat
Pyruvat
Insulin

Tab. 9

Probe	Glucose mg%	Glucose µMol/l	Lactat µMol/l	Pyruvat µMol/l	L/P	Insulin µE/ml	Insulin $x10^{-3}$ µMol/l
Versuch 18							
"Leerperf."							
AM	198	11010	1580	240	6	620	3,82
1.DL	208	11550	1680	232	6	490	3,02
2."	202	11220	1650	231	6	480	2,96
3."	205	11380	1635	233	6	365	2,25
4."	207	11500	1664	241	6	300	1,85
5."	204	11340	1680	243	6	285	1,75
6."	203	11270	1664	229	6	260	1,60
7."	202	11220	1664	226	6	225	1,38
Versuch 19							
"Leerperf."							
AM	203	11280	1354	234	6	780	4,81
1.DL	205	11380	1440	232	6	565	3,48
2."	209	11610	1450	238	6	535	3,30
3."	204	11330	1397	233	6	425	2,62
4."	205	11380	1440	263	6	325	2,00
5."	201	11150	1420	251	6	250	1,54
6."	199	11050	1440	242	6	200	1,23
7."	200	11110	1440	247	6	190	1,17
Versuch 20							
"Leerperf."							
AM	205	11380	1820	249	7	1860	11,48
1.DL	203	11280	1800	248	7	1605	9,90
2."	205	11380	1860	232	8	1200	7,40
3."	205	11380	1830	224	8	1125	6,49
4."	204	11330	1775	252	7	1025	6,32
5."	204	11330	1830	251	7	980	6,04
6."	203	11280	1830	250	7	980	6,04
7."	203	11280	1820	246	7	800	4,93

Meßergebnisse aus 3 "Leerperfusionen" mit Aureomycin-haltigem Medium

Diskontinuierliche Perfusion, Probenentnahme: Nullwert (OW) ohne Insulin. Nach Zugabe des Insulins wurde das Medium wie unter normalen Perfusionsbedingungen 15 Minuten gerührt, dann erst wurde der Insulinausgangswert (AM: Ausgangsmedium) entnommen. Weitere Proben wurden jeweils 5 Minuten nach Anfang eines neuen Durchlaufs (DL) entnommen.

Die Versuchsergebnisse in Tabelle 9 zeigen deutlich, daß in den drei durchgeführten "Leer-Perfusionen" bei Anwesenheit von Aureomycin im Perfusionsmedium ein starker Insulinschwund von 64 % in Versuch 18, in Versuch 19: 76 % und in Versuch 20: 57 % zu beobachten war.

Die Meßwerte von Glucose, Lactat und Pyruvat verhielten sich über die Zeit der "Leer-Perfusion" fast konstant.

In allen oben aufgeführten Untersuchungen zeigte sich, daß bei Anwesenheit von Aureomycin im Versuchsmedium das zugesetzte Insulin "abgebaut" wurde bzw. das eingesetzte Insulin nur noch zum Teil immunologisch nachgewiesen werden konnte. So konnte Aureomycin unter diesen Versuchsbedingungen als Bakteriostaticum nicht weiter eingesetzt werden. Der mögliche Einfluß des Aureomycins auf das Insulinmolekül sollte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, er müßte an anderer Stelle untersucht werden.

Ein anderes Breitbandantibioticum ist Penicillin. Wie beim Aureomycin mußten auch mit Penicillin die erforderlichen Vorversuche durchgeführt werden.

3.1.3.4 Inkubationsversuche mit Penicillin

Versuchsbedingungen:

Medium: 100 ml KHB-Puffer
+ 1000 I.E. Penicillin-G (Na-Salz)/100 ml
+ 500 - 700 µE Insulin/ml

Meßwerte: Insulin

Versuchsanordnung: Die Inkubationsmedien wurden im Scheibenoxygenator bei 37° C gerührt und begast. Probenentnahmen alle 20 Minuten.

Begasung: Versuch 21 mit 95 % O_2 / 5 % CO_2
Versuch 22 mit 100 % CO_2
Versuch 23 mit N_2 (Pyrogalol)

Die Insulinmeßwerte der Inkubationsversuche 21, 22 und 23 sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tab. 10

Probe (min)	Versuch 21 (O_2/CO_2) Insulinkonz.		Versuch 22 (CO_2) Insulinkonz.		Versuch 23 (N_2) Insulinkonz.	
	µE/ml	$x10^{-3}$ µMol/l	µE/ml	$x10^{-3}$ µMol/l	µE/ml	$x10^{-3}$ µMol/l
0	62	3,86	44	2,74	675	4,16
20	51	3,17	170	1,04	585	3,61
40	45	2,80	135	0,83	550	3,39
60	43	2,68	65	0,40	545	3,36
80	42	2,62	60	0,37	540	3,33
100	40	2,49	35	0,21	445	2,74
120	39	2,40	25	0,15	435	2,68

Insulinmeßergebnisse aus 3 Inkubationsversuchen mit Penicillin im Medium

Die Versuchsergebnisse aus Tabelle 10 zeigen, daß auch unter dem Zusatz von Penicillin ein Insulinschwund zu beobachten war. Bei O_2 CO_2-Begasung verschwanden 38 % des eingesetzten Insulins. Unter CO_2-Begasung verschwanden sogar 94 % und unter N_2-Begasung 36 % der Insulinausgangskonzentration. Unter O_2 CO_2-Begasung keine Änderung des pH-Wertes, bei CO_2 ein Absinken auf 6,2, bei N_2 ein Anstieg auf einen pH-Wert von 9,2 nach einer Inkubationsdauer von 120 Minuten.

In allen drei Inkubationsversuchen konnten keine sichtlichen Veränderungen beobachtet werden.

3.1.3.5 Inkubationsversuche mit Penicillin im nicht begasten Medium

Versuchsbedingungen:

Versuchsanordnung: Das Versuchsmedium befand sich in den Inkubationsversuchen 24, 25 und 26 in einem Becherglas, das in einem auf 37° C temperierten Wasserbad stand. Die Medien wurden nicht gerührt und nicht begast. Probenentnahmen alle 20 Minuten.

Meßwerte: Insulin

Die Insulinmeßergebnisse sind in der Tabelle 11 zusammengefaßt.

Tab. 11

Probe (min)	Versuch 24 Insulinkonz.		Versuch 25 Insulinkonz.		Versuch 26 Insulinkonz.	
	µE/ml	$x10^{-3}$µMol/l	µE/ml	$x10^{-3}$µMol/l	µE/ml	$x10^{-3}$µMol/l
0	620	3,82	530	3,27	555	3,42
20	610	3,76	495	3,05	495	3,05
40	600	3,70	485	2,99	490	3,02
60	595	3,67	470	2,90	480	2,96
80	575	3,54	445	2,74	475	2,93
100	565	3,48	425	2,62	465	2,87
120	550	3,39	420	2,59	465	2,87

Inkubationsversuche mit Penicillin im Medium

Auch im nicht gerührten und nicht begasten Inkubationsmedium konnte, wie die Tabelle 11 zeigt, im Versuch 24 ein Insulin-

schwund von 11 %, im Versuch 25 ein Insulinschwund von ca. 21 % und im Versuch 26 ein Insulinschwund von ca. 16 % am Ende der Inkubationszeit gemessen werden.

Nachdem in den vorstehend aufgeführten Inkubationsversuchen auch unter Anwesenheit von Penicillin-G im Medium ein Insulinschwund zu beobachten war, sollte auf den Zusatz eines Antibioticums im Perfusionsmedium verzichtet werden.

Wiederholte Keimzahlbestimmungen im Medium am Anfang, während und am Ende einer Leberperfusion zeigten keinen nennenswerten Keimzuwachs. *)

Eine mögliche histologische Veränderung der Leberzellen innerhalb eines Perfusionsversuches konnte am gleichen Leberpräparat nicht gezeigt werden, da auf eine Gewebsentnahme vor und während der Leberperfusion verzichtet wurde.

So wurde davon ausgegangen, daß bei Entnahme von 10 Tieren eines größeren Ratten-Pools (gleicher Stamm, gleiches Geschlecht, gleiches Gewicht, gleiche Aufzuchts- und Ernährungsbedingungen) die histologischen Befunde von 5 Rattenlebern, unbehandelte, intakte Ratten (Tötung durch Dekapitierung), und 5 Lebern nach einer 120 Minuten dauernden Perfusion zu vergleichen waren. Die erhaltenen Befunde sprechen für keine durch die Perfusion entstandenen histologischen Veränderungen. **)

---

*) Ich danke Herrn Dr. Keßler, Department Chemotherapie der Schering AG Berlin, für die Befundung der durchgeführten Plattentests.

**) Ich danke Frau Dr. Mehring, Department Endokrinpharmakologie der Schering AG Berlin, für die histologischen Befunde.

3.2 Untersuchungen zur Brauchbarkeit des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber zum Studium des Insulinabbaus

In mehreren Leberperfusionsversuchen wurde unter sorgfältiger Einhaltung der Standardbedingungen der Insulinschwund, ausgehend von verschiedenen Insulinkonzentrationen, bestimmt.

Standardbedingungen:

Versuchstiere:	Wistar-Ratten, 220-240 g schwer, Geschlecht ♂
Fütterung:	24 Std. nüchtern, sonst Altromin R, Wasser ad libitum
Operation:	wie unter 2.4 beschrieben
Versuchsdurchführung:	wie unter 2.5.4 beschrieben
Perfusionsmedium:	Standardmedium, siehe unter 2.2 Erythrozyten-haltig, Antibiotica-frei
Meßwerte:	Glucose Lactat Pyruvat > L/P-Quotient GOT, GPT K^+ Insulin

Die Einzelergebnisse von elf Leberperfusionen sind in den Tabellen 12, 12a und 12b zusammengefaßt.

Erläuterung der Abkürzungen:

PERF.:	Perfusion
Vorperf.:	Vor-Perfusion
Hauptperf.:	Haupt-Perfusion
AM:	Anfangsmedium
EM:	Endmedium
DL:	Durchlauf

PERF. Probe	Glucose mg%	Glucose µMol/l	Lactat µMol/l	Pyruvat µMol/l	L/P	Insulin µE/ml	Insulin nMol/l	GOT mE/ml	GPT mE/ml	K^+ µVal/l
Perfusion Nr.26										
Vorperf.										
AM	200	11100	1536	202	8	0	0	3,1	2,7	5,6
EM	212	11780	832	114	6	0	0	5,4	2,7	5,0
Hauptperf.										
AM	200	11100	1691	173	10	750	4,63	2,7	2,2	5,5
1.DL	208	11560	1621	161	10	560	3,46	4,5	3,6	5,5
2."	201	11170	1607	156	10	435	2,68	4,9	3,6	5,6
3."	194	10780	1564	147	11	355	2,19	6,7	4,5	5,5
4."	201	11170	1550	144	11	230	1,49	7,7	4,9	5,2
5."	202	11230	1559	124	12	180	1,11	9,2	5,4	5,5
6."	201	11170	1550	126	12	155	0,96	10,7	6,5	5,3
7."	194	10780	1382	111	12	125	0,77	18,8	9,4	5,5
Perfusion Nr.27										
Vorperf.										
AM	210	11670	1540	213	7	0	0	2,2	3,6	5,7
EM	218	12110	395	81	5	0	0	3,6	2,2	6,4
Hauptperf.										
AM	207	11500	1510	200	8	895	5,50	3,6	1,8	6,4
1.DL	206	11450	1520	156	10	710	4,38	4,0	2,7	6,7
2."	204	11330	1410	175	8	675	4,17	4,9	2,2	6,9
3."	205	11380	1420	185	8	480	2,96	4,5	1,8	7,0
4."	206	11450	1450	170	8	440	2,72	5,8	2,2	7,1
5."	207	11500	1420	159	9	260	1,61	7,2	2,7	5,9
6."	202	11220	1400	145	10	170	1,05	8,5	2,2	7,0
Perfusion Nr.28										
Vorperf.										
AM	194	10780	1480	212	7	0	0	3,1	2,7	6,0
EM	217	12050	338	85	4	0	0	4,1	9,0	7,0
Hauptperf.										
AM	203	11280	1465	214	7	650	4,02	3,6	2,2	6,7
1.DL	196	10890	1339	124	11	390	2,41	8,5	3,6	7,4
2."	207	11500	1128	125	9	340	2,09	13,9	4,5	7,6
3."	208	11550	1076	139	8	190	1,17	21,6	6,3	7,6
4."	206	11450	1255	134	8	110	0,68	31,6	9,9	7,9
5."	212	11780	1170	131	8	75	0,46	37,9	13,9	8,0
6."	203	11280	1199	121	8	50	0,31	42,2	13,5	7,9
7."	216	12000	1211	130	9	30	0,18	49,2	17,5	8,3
Perfusion Nr.29										
Vorperf.										
AM	189	10510	1521	249	6	0	0	3,4	2,2	6,2
EM	214	11890	592	122	5	0	0	223,0	150,4	6,2
Hauptperf.										
AM	191	10620	1579	247	6	810	5,00	4,5	3,1	6,7
1.DL	190	10580	1410	214	7	585	3,61	40,7	23,7	7,0
2."	194	10780	1381	211	7	395	2,44	81,7	40,7	7,2
3."	193	10720	1381	211	7	150	0,93	161,1	81,9	7,1
4."	195	10830	1325	199	7	65	0,40	190,4	102,8	7,8
5."	192	10670	1336	188	7	10	0,07	193,0	122,2	8,0
6."	192	10670	1311	189	7	10	0,07	184,0	138,9	8,0
7."	195	10830	1269	186	7	0	0,00	186,5	155,4	8,0
Perfusion Nr.30										
Vorperf.										
AM	212	11800	960	250	4	0	0	6,0	1,8	4,0
EM	255	14200	2170	282	8	0	0	6,9	3,7	5,4
Hauptperf.										
AM	220	12200	1040	231	4	1095	6,77	6,5	1,3	3,1
1.DL	230	13350	1690	208	8	675	4,17	7,1	3,1	4,9
2."	227	12600	1710	190	9	585	3,61	6,7	2,1	5,8
3."	226	12550	1520	203	8	500	3,09	6,9	1,8	4,9
4."	225	12500	1470	179	8	420	2,59	7,1	0,8	6,7
5."	227	12600	1510	195	8	286	1,77	7,1	1,9	5,4
6."	222	12350	1300	193	7	195	1,21	6,8	3,1	5,4

Tab. 12: Meßergebnisse von 5 Leberperfusionen unter Standardbedingungen durchgeführt.

PERF. Probe	Glucose mg%	Glucose µMol/l	Lactat µMol/l	Pyruvat µMol/l	L/P	Insulin µE/ml	Insulin nMol/l	GOT mE/ml	GPT mE/ml	K^+ µVal/l
Perfusion Nr.31										
Vorperf.										
AM	203	11280	1468	226	6	0	0	2,7	2,1	5,5
EM	210	11680	818	138	6	0	0	5,4	2,1	5,1
Hauptperf.										
AM	195	10840	1622	205	7	680	4,18	3,1	1,8	5,4
1.DL	192	10680	1721	166	9	515	3,18	4,4	2,1	5,5
2."	191	10620	1779	207	7	400	2,47	7,5	1,8	5,4
3."	172	9540	2060	237	7	300	1,85	8,5	3,1	5,5
4."	186	10340	2035	246	8	205	1,26	13,0	4,9	5,6
5."	190	10560	2175	234	9	160	0,98	17,5	5,4	5,8
6."	181	10060	2230	223	10	120	0,74	22,8	6,7	5,6
7."	178	9880	2202	217	10	90	0,55	26,9	8,1	5,1
Perfusion Nr.32										
Vorperf.										
AM	200	11100	1668	249	7	0	0	6,4	4,9	5,7
EM	214	11890	987	65	8	0	0	8,2	6,9	6,1
Hauptperf.										
AM	201	11170	1778	225	8	770	4,76	5,5	3,9	5,6
1.DL	208	11560	1779	140	13	570	3,52	5,5	6,2	5,4
2."	210	11618	1509	182	8	515	3,18	10,2	7,2	5,7
3."	204	11330	1468	201	7	390	2,41	11,0	5,4	5,9
4."	201	11170	1468	216	7	330	2,04	14,8	5,4	5,8
5."	202	11230	1495	211	7	270	1,66	16,8	7,2	5,8
6."	200	11100	1495	207	7	235	1,45	28,0	12,5	5,8
Perfusion Nr.33										
Vorperf.										
AM	208	11560	1438	185	8	0	0	3,8	2,5	5,7
EM	219	12170	1480	145	10	0	0	5,1	3,4	5,9
Hauptperf.										
AM	191	10620	1551	172	9	535	3,31	3,4	3,0	5,6
1.DL	188	10460	1861	166	11	500	3,09	3,8	3,8	5,9
2."	188	10460	1877	239	8	470	2,90	4,2	3,0	5,8
3."	186	10340	2175	302	7	434	2,67	5,9	3,8	5,6
4."	183	10180	2365	315	7	365	2,25	17,8	5,5	5,8
5."	185	10280	2510	332	8	310	1,91	29,2	10,0	5,8
6."	186	10340	2821	305	9	220	1,36	30,6	11,1	6,5
7."	173	9620	3078	280	11	120	0,74	44,2	12,4	6,7
Perfusion Nr. 34										
Vorperf.										
AM	194	10780	1932	175	9	0	0	5,1	3,8	5,4
EM	212	11780	2215	85	26	0	0	25,4	7,2	6,2
Hauptperf.										
AM	202	11230	1807	174	10	635	3,92	4,2	3,8	5,8
1.DL	199	11070	1832	110	17	444	2,74	8,4	4,6	5,4
2."	198	11010	1791	144	12	392	2,42	8,4	4,6	5,8
3."	197	10960	1961	175	11	270	1,67	17,8	8,0	5,7
4."	188	10460	2215	197	11	235	1,45	22,4	8,4	5,6
5."	200	11200	2425	248	10	165	1,02	28,4	11,0	5,8
6."	196	10890	2510	266	9	120	0,74	38,6	14,4	6,0
7."	200	11200	2370	283	8	95	0,58	43,2	16,5	6,0
Perfusion Nr.35										
Hauptperf.										
AM	196	10890	1522	159	10	0	0	5,0	1,2	5,7
EM	210	11780	1268	172	12	0	0	8,4	1,6	4,8
Hauptperf.										
AM	199	11070	2495	172	14	870	5,37	4,6	1,1	5,4
1.DL	192	10680	1749	134	13	635	3,92	6,5	2,1	5,5
2."	192	10680	2030	172	12	485	2,98	8,8	3,0	5,6
3."	190	10560	2420	190	13	315	2,25	9,6	5,0	5,7
4."	200	11100	2510	187	13	285	1,76	11,8	6,2	5,8
5."	201	11170	2425	192	13	190	1,17	13,2	6,8	5,8
6."	200	11100	2380	192	12	165	1,01	15,1	7,0	5,7

Tab. 12a: Meßergebnisse von 5 Leberperfusionsversuchen

PLRF. Probe	Glucose mg%	Glucose µMol/l	Lactat µMol/l	Pyruvat µMol/l	L/P	Insulin µE/ml	Insulin nMol/l	GOT mE/ml	GPT mE/ml	K^+ µVal/l
Perfusion Nr.36										
Vorperf.										
AM	201	11170	1522	185	8	0	0	2,1	4,1	5,7
EM	225	12510	1240	159	8	0	0	2,5	5,9	5,3
Hauptperf.										
AM	199	11070	1805	152	12	790	4,88	3,4	5,3	5,6
1.DL	200	11100	2085	168	12	545	3,36	3,4	4,6	5,2
2."	199	11070	2028	229	9	345	2,13	3,8	4,2	5,0
3."	196	10890	2225	275	8	265	1,64	5,9	5,9	5,3
4."	197	10960	2563	237	11	196	1,20	8,9	8,0	5,4
5."	194	10780	2423	254	10	175	1,08	17,8	8,4	5,8
6."	196	10890	2325	236	10	135	0,83	19,9	10,6	5,6
7."	196	10890	2085	216	10	105	0,64	24,1	11,6	5,8

Tab. 12b: Zusammenfassung der Meßergebnisse einer Leberperfusion, die unter Einhaltung der Standardbedingungen durchgeführt wurde.

Aus den Ergebnissen in den voranstehenden Tabellen 12, 12a und 12b folgt, daß die Glucosekonzentration im Perfusionsmedium in allen Versuchen weitgehend konstant blieb. Das gleiche konnte für den Lactat-/Pyruvat-Quotienten und die K^+-Konzentration im Medium beobachtet werden.

Aus den Transaminasewerten geht hervor, daß bis zum 4./5. Durchlauf die Werte normal sind, dann jedoch eine Erhöhung der Werte zu beobachten war, die möglicherweise mit einer Zellmembranschädigung einhergeht. Es kam jedoch nur in einem Leberperfusionsversuch zu einem sehr starken Transaminaseaustritt aus der Leberzelle in das Perfusionsmedium, siehe Perfusion 29, Tabelle 12. Aufgrund der gemessenen Transaminasewerte im Perfusionsmedium sollten in den folgenden Leberperfusionsversuchen nicht mehr als 4 Durchläufe durchgeführt werden, damit davon ausgegangen werden konnte, daß keine mögliche Zellmembranschädigung mit einhergehender Permeabilitätsänderung, die gemessenen Werte beeinflußte.

Für den intakten Zustand der perfundierten Lebern sprach auch die beobachtete Cholerese. Die Gallenproduktion betrug 0,5 ± 0,1 ml über 120 Minuten. Nach STAIB und Mitarbeitern (99) wäre ein Stagnieren des Gallenflusses ein Frühzeichen des allgemeinen Versagens des Organs. Die in den oben beschriebenen

Perfusionen gemessene Menge an Galle, entspricht den veröffentlichten Untersuchungsergebnissen (99) an Leberperfusionsversuchen mit halbsynthetischem Perfusionsmedium.

Die Durchflußrate von 1,2 - 1,4 ml/g Leberfeuchtgewicht/min sollte aufgrund der beobachteten guten Sauerstoffsättigung (siehe L/P-Quotienten) im Medium beibehalten werden.

In der nachfolgenden Tabelle 13 sind die Insulinmeßergebnisse der elf vorstehend beschriebenen Leberperfusionen zusammengefaßt. Ausgehend von der jeweiligen Insulinkonzentration im Perfusionsanfangsmedium (AM), angegeben in µE/ml,

	Perfusion Nr.	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
INSULIN-KONZ.	Ausgangsmedium µE/ml	750	895	650	810	1095	680	770	535	635	870	790
	x10^{-3} µMol/l	4,63	5,50	4,02	5,00	6,77	4,18	4,76	3,31	3,92	5,37	4,88
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
INSULINSCHWUND pro Durchlauf	1.Durchlauf µE/ml	190	185	260	225	421	165	200	35	190	235	245
	x10^{-3} µMol/l	1,17	1,12	1,61	1,39	2,60	1,00	1,24	0,22	1,18	1,45	1,52
	%	25,4	20,7	40,1	27,8	38,4	24,3	28,6	6,54	29,9	27,1	31,0
	2.Durchlauf µE/ml	315	220	310	415	512	280	255	65	243	385	445
	x10^{-3} µMol/l	1,95	1,33	1,93	2,56	3,16	1,71	1,58	0,41	1,50	2,39	2,75
	%	41,9	24,6	47,6	51,2	46,7	41,1	33,1	12,1	38,3	44,2	56,3
	3.Durchlauf µE/ml	395	415	460	660	596	380	380	101	365	555	525
	x10^{-3} µMol/l	2,44	2,54	2,85	4,07	3,68	2,34	2,34	0,64	2,25	3,12	3,24
	%	52,7	46,7	70,7	81,5	54,4	55,9	49,4	18,9	57,5	63,8	66,5
	4.Durchlauf µE/ml	520	455	540	745	677	475	440	170	400	585	594
	x10^{-3} µMol/l	3,21	2,78	3,34	4,60	4,18	2,93	2,72	1,06	2,47	3,61	3,68
	%	69,4	50,8	83,2	92,0	61,7	70,0	57,2	31,8	63,5	67,4	75,5
	5.Durchlauf µE/ml	570	635	575	800	810	520	500	226	470	680	615
	x10^{-3} µMol/l	3,52	3,89	3,56	4,93	5,00	3,20	3,10	1,40	2,90	4,20	3,80
	%	76,1	71,0	88,3	98,8	73,9	76,5	64,9	42,2	75,0	78,2	78,0
	6.Durchlauf µE/ml	595	725	600	800	900	560	535	315	515	706	655
	x10^{-3} µMol/l	3,67	4,45	3,71	4,93	5,56	3,44	3,31	1,95	3,18	4,36	4,05
	%	79,4	81,0	92,3	98,8	82,1	82,5	69,4	58,9	81,0	81,1	83,0

Tab. 13: Insulinschwund in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration im Perfusionsausgangsmedium

in x 10^{-3} µMol/l und in %, zeigt die Tabelle 13, wieviel Insulin pro Durchlauf (das gesamte Medium hat einmal die Leber durchlaufen) von dem eingesetzten Insulin nicht mehr immunologisch im Medium bestimmt werden konnte. Zum Beispiel Perfusion Nr. 26: Die Insulinkonzentration im Ausgangsmedium wird mit 100 % angegeben, davon verschwinden im 1. Durchlauf 25,4 %, im 2. Durchlauf 41,9 % von den eingesetzten 100 % und im 6. Durchlauf konnte nur noch 20,6 % der Insulinausgangskonzentration gemessen werden, d.h. der Insulinschwund betrug 79,4 %.

Die in der Tabelle 13 zusammengefaßten Insulinmeßergebnisse der diskontinuierlichen Perfusion der Rattenleber mit verschiedenen Insulinausgangskonzentrationen können im Sinne einer "zerhackten Enzymreaktion" verstanden werden.

Bei der Messung eines enzymatischen Umsatzes im Reaktionskolben geht man von einer bekannten und konstant bleibenden Enzymmenge aus. Die eingesetzte Substratmenge ist ebenfalls bekannt, nimmt aber während der Reaktion kontinuierlich, d.h. stufenlos ab. Bei der diskontinuierlichen Leberperfusion kann man, entsprechend den Versuchsbedingungen im Reaktionskolben, die den Umsatz bewirkende Enzymmenge in der Leber als konstant annehmen. Bei der diskontinuierlichen Perfusion nimmt aber die Substratkonzentration nicht stufenlos kontinuierlich ab, sondern stufenweise entsprechend den einzelnen Durchläufen.

Aus dieser Überlegung folgt, daß man den Insulinschwund an der diskontinuierlich perfundierten Leber, in Abhängigkeit von den einzelnen Durchläufen, analog der, in der Enzymkinetik gebräuchlichen Zeit-Umsatz-Kurve, behandeln kann (siehe Abb. 4).

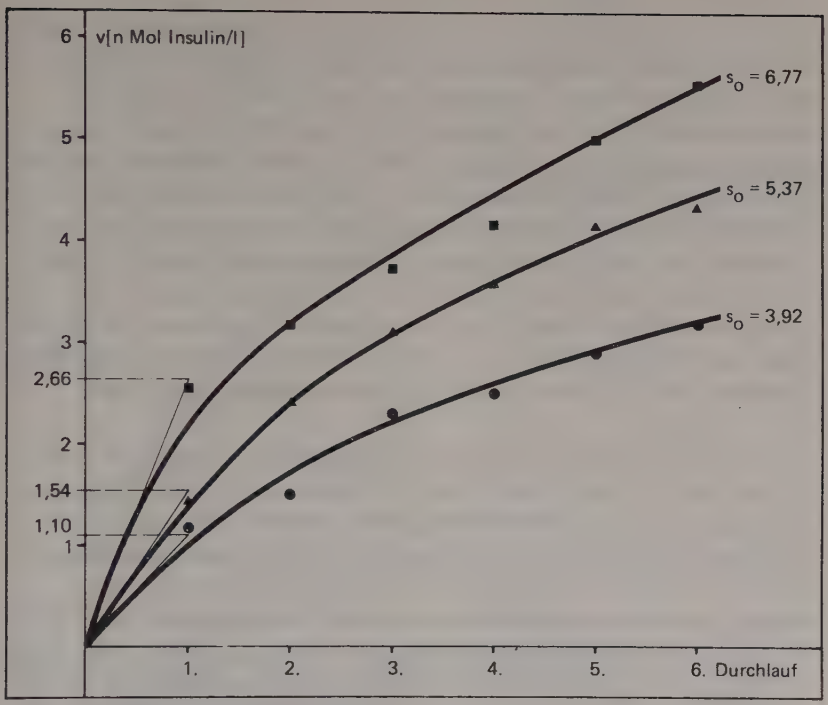


Abb. 4: Insulinschwund (v) in Abhängigkeit von der Insulinausgangskonzentration (s_o), Angaben in nMol/l

Die in der Abbildung 4 für die jeweiligen Insulinausgangskonzentrationen ermittelten initialen Abbaugeschwindigkeiten geben die Insulinmenge an, die von der Leber in jeweils 5 Minuten bei konstantem Substratangebot umgesetzt wird. Die graphische Ermittlung der initialen Insulinabbaugeschwindigkeiten ergab, daß mit steigender Insulinausgangskonzentration die initiale Insulinabbaugeschwindigkeit zunahm.

Es soll hier noch einmal betont werden, daß man bei der diskontinuierlichen Leberperfusion tatsächlich von einem konstanten Substratangebot sprechen kann, da ja die Substratkonzentration im Perfusionsmedium während der einzelnen Durchläu-

fe konstant bleibt.

Aus den obigen Beobachtungen geht hervor, daß die initiale Abbaugeschwindigkeit abhängig von der Höhe der Insulinausgangskonzentration im Medium ist. Diese Beobachtung entspricht den Gesetzen der Enzymkinetik nach Michaelis Menten, die besagen, daß bei steigender Substratkonzentration die initiale Reaktionsgeschwindigkeit bis zu einem Maximalwert zunimmt, der auch bei weiterer Substratzugabe nicht erhöht werden kann. Vergleicht man diese Aussage mit den in den Leberperfusionen erhaltenen Insulinmeßergebnissen, so findet sich eine Übereinstimmung, da mit Erhöhung der Ausgangskonzentration auch die initiale Abbaugeschwindigkeit zunimmt.

Für einen Vergleich der Insulinabbaugeschwindigkeiten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ist die Höhe der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit, genannt der V_{max}-Wert, wichtig. Aus dem V_{max}-Wert läßt sich die Michaelis-Konstante (K_m) ermitteln (siehe auch Abb. 5). Der K_m-Wert beträgt 1/2 V_{max}, d. h., dieser Wert gibt die Konzentration an, bei der die halbe Maximalgeschwindigkeit erreicht wird. Mit Hilfe des V_{max}- und des K_m-Wertes bietet sich eine Möglichkeit an, den durch ein Enzymsystem katalysierten Abbau eines Substrates, zu beurteilen.

Aus der Tabelle 13 ist zu ersehen, daß in allen 11 Perfusionen ein Insulinschwund gemessen werden konnte. Anhand dieser Perfusionsergebnisse zeigte sich schon ein Weg zur möglichen Auswertung der folgenden Leberperfusionsergebnisse.

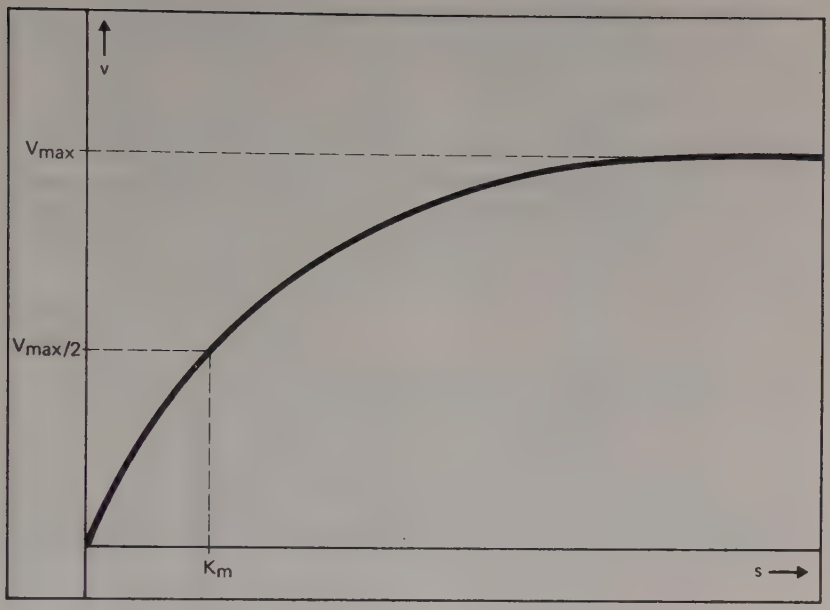


Abb. 5: Allgemeine Darstellung einer enzymatischen Reaktion. Reaktionsgeschwindigkeit (v) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (s)

3.3 Untersuchungen über mögliche endokrinologische und ernährungsbedingte Einflüsse auf den Insulinabbau am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber

Um einen möglichen endokrinologisch- und/oder ernährungsbedingten Einfluß auf den Insulinabbau beobachten zu können, mußte eine Vergleichsgruppe an Ratten gewählt werden, deren Insulinabbaukurve als normal definiert werden kann. 24 Std. nüchterne, intakte Wistar-Ratten, Geschlecht männlich, 220 - 240 g schwer, wurden als Vergleichsgruppe benutzt.

3.3.1 Insulinabbau der Lebern von 24 Std. nüchternen, unbehandelten Ratten

In der Tabelle 14 sind die Insulinmeßergebnisse von 16 Leberperfusionen an 24 Std. nüchternen Ratten aufgeführt. Die Leberperfusionen wurden unter Einhaltung der Standardbedingungen (siehe unter 3.2) durchgeführt.

Wie in der vorangehenden Tabelle 13 ist in der Tabelle 14 der Insulinschwund pro Durchlauf (DL) immer auf die jeweilige Insulinkonzentration im Ausgangsmedium (AM) bezogen.

Z.B. Perfusion Nr. 40: Die Insulinausgangskonzentration im Perfusionsmedium beträgt 1100 µE/ml, das sind umgerechnet 6,79 nMol Insulin/l. Dieser Ausgangswert wird gleich 100 % gesetzt. Im 1. Durchlauf verschwinden 295 µE Insulin/ml bzw. 26,8% der eingesetzten Insulinausgangskonzentration. Nach zwei Durchläufen sind insgesamt 455 µE Insulin/ml verschwunden, d.h. die Insulinschwundraten aus dem 1. und dem 2. Durchlauf werden addiert. Nach vier Durchläufen konnten nur noch 535 µE Insulin/ml immunologisch nachgewiesen werden, d.h. am Ende der Perfusion sind 665 µE Insulin/ml von den eingesetzten 1100 µE/ml verschwunden bzw. abgebaut.

	Perfusion-N Nr.		40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55
INSULIN-KONZ.	AM	µE/ml	1100	1245	1160	1200	1235	1240	1100	3630	4290	3570	4268	3795	2464	2134	2277	2020
		nMol/l	6,79	7,69	7,16	7,41	7,65	7,62	6,79	22,41	26,48	22,06	26,35	23,42	15,21	13,17	14,05	12,47
		%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
INSULIN - SCHWUND	1.DL	µE/ml	295	670	325	370	395	350	220	193	616	231	617	418	528	363	479	330
		nMol/l	1,82	4,14	2,01	2,29	2,15	2,43	1,36	0,89	3,80	1,42	3,81	2,57	3,26	2,24	2,98	2,04
		%	26,8	53,8	28,0	30,8	31,9	28,2	20,0	5,31	14,3	6,46	14,4	11,0	21,4	17,0	21,0	16,3
	2.DL	µE/ml	455	805	528	568	610	615	445	374	847	572	902	836	814	528	825	441
		nMol/l	2,81	4,97	3,26	3,51	3,79	3,76	2,75	2,31	5,23	3,52	5,57	5,16	5,02	3,26	5,09	2,76
		%	41,4	64,6	45,5	44,0	49,4	49,6	40,4	10,3	19,7	16,0	21,1	22,0	33,0	24,7	36,2	21,8
	3.DL	µE/ml	615	1060	605	750	730	840	515	747	924	1001	1174	935	1078	825	836	623
		nMol/l	3,80	6,55	3,73	4,63	5,18	4,50	3,18	4,62	5,70	6,18	7,25	5,77	6,66	5,09	5,16	3,85
		%	55,9	85,1	52,1	62,7	69,1	67,7	46,8	20,6	21,5	28,0	27,4	24,6	43,7	38,6	36,7	30,8
	4.DL	µE/ml	665	1120	820	890	840	955	615	1001	1210	1408	1331	1133	1342	1100	924	964
		nMol/l	3,83	6,92	4,56	5,50	5,89	5,18	3,80	6,18	7,47	8,68	8,22	6,99	8,28	6,79	5,70	5,95
		%	60,4	89,9	70,7	74,2	68,0	77,0	55,9	27,5	28,2	39,3	21,2	29,8	54,4	51,5	40,5	47,7

Tab. 14: Beobachteter Insulinschwund an 16 Leberperfusionen 24 Std. nüchterner Ratten

Aus der Tabelle 14 ist zu ersehen, daß in allen 16 Leberperfusionen die jeweils eingesetzte Insulinausgangskonzentration nach 4 Durchläufen sichtlich reduziert ist.

Um den beobachteten Verlauf des Insulinabbaus nicht nur biologisch, sondern auch statistisch abzusichern, wurden mehrere Funktionsgleichungen dem Verlauf der Insulinabbaukurve angeglichen.*) Am geeignetesten erwies sich danach die Michaelis-Menten-Gleichung:

$$v = \frac{V_{max} \cdot [s]}{K_m + [s]}$$

v = Substrat-Schwund
$[s]$ = Substrat-Konzentration
K_m = Michaelis-Konstante
V_{max} = maximaler Insulinschwund

Bei der Auswertung der nachfolgenden Leberperfusionsergebnisse zeigte sich jedoch, daß bei einigen Fragestellungen extrem hohe Insulinkonzentrationen hätten eingesetzt werden müssen, um Insulinmeßwerte im Sättigungsbereich der Abbaukurve zu erhalten.

Die Ergebnisse der Leberperfusionsversuche wurden daher nicht durch mathematische Angleichung, sondern graphisch nach Lineweaver-Burk ausgewertet.

Ermittelt man von mehreren Insulinabbauversuchen (siehe Tab. 14) die jeweilige initiale Abbaugeschwindigkeit (v_o), siehe Abb. 6, und trägt diese sowie die dazugehörige Insulinausgangskonzentration (s_o) doppelt reziprok auf (1/v gegen 1/s), dann erhält man eine Gerade, siehe Abb. 7. Sie schneidet die Ordinate in $1/V_{max}$ und die Abszisse in $-1/K_m$. Rechnet man die reziproken Werte um, so erhält man den V_{max}- und den K_m-Wert, siehe Tabelle 15.

---

*) Ich danke Herrn Dr. Wiemann, Department Biometrie und Statistik der Schering AG, für die Beratung in allen statistischen Fragen.

Leberperfusionen - N: 24 Std. nüchterne Ratten, unbehandelt, Graph. Ermittlung des V_{max}- und K_m-Wertes nach Lineweaver-Burk

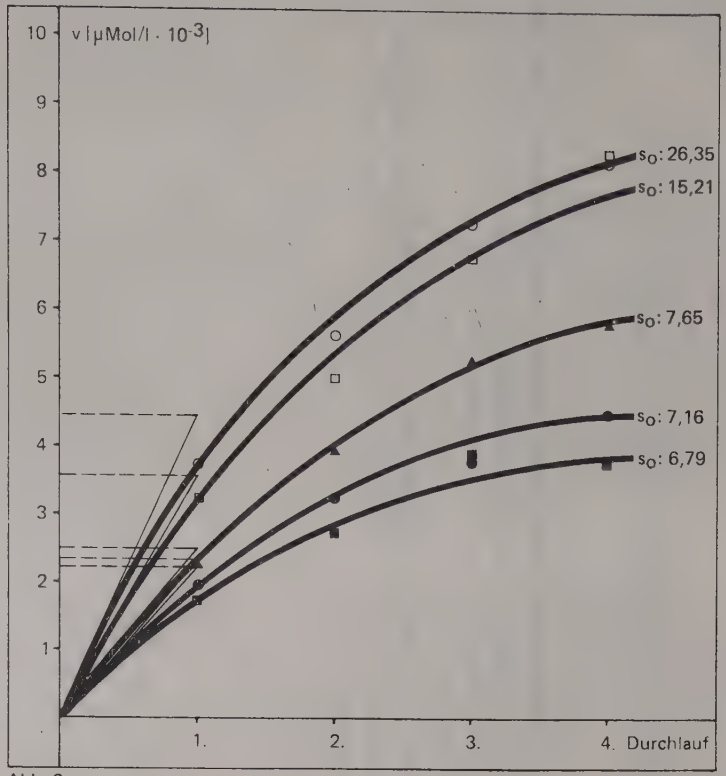


Abb. 6

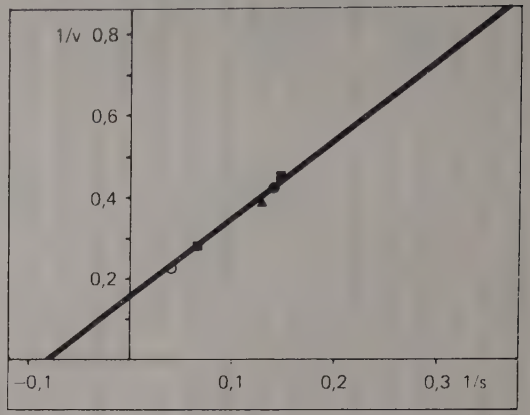


Abb. 7

Angabe in µMol Insulin/l 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
26,35	0,0379	4,45	0,224
15,21	0,0657	3,62	0,276
7,65	0,1307	2,60	0,385
7,16	0,1396	2,35	0,425
6,79	0,1472	2,19	0,456

$V_{max} = \frac{1}{0,152} = 6,57$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 1065,78 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0,079} = 12,65$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 2050,59 µE Insulin/ml

Tab. 15

Die isoliert perfundierte Leber unbehandelter, 24 Std. nüchterner Ratten baut, ausgehend von den voranstehenden Ergebnissen, demnach in 5 Minuten maximal, d. h. bei Substratsättigung ca. 7 nMol Insulin/l oder entsprechend ca. 7 pMol Insulin/ml ab, wobei hier noch einmal zu betonen ist, daß "Abbau" bedeutet, daß das Insulin immunologisch nicht mehr nachweisbar ist. Da in den vorstehend beschriebenen Versuchen das Leberfeuchtgewicht im Durchschnitt ca. 9,0 g betrug, gilt, daß die Lebern der unbehandelten 24 Std. nüchternen, männlichen Ratte unter den angewandten Versuchsbedingungen maximal 0,2 pMol Insulin/ml Perfusionsmedium/g Feuchtgewicht pro min abbaut. 0,2 pMol ist etwa 1,0 ng Insulin und entspricht ca. 0,5 µE Insulin. Daraus folgt, daß bei einem Lebergewicht von ca. 10,0 g von der 24 Std. nüchternen Ratte maximal 5 µE/min/ml abgebaut werden können. Bei einem Durchflußvolumen von ca. 10,0 ml/min werden demnach maximal 50 µE/min durch die Gesamtleber abgebaut.

3.3.2 Insulinabbau in der Leber gefütterter Ratten

Die an der isoliert perfundierten Leber von gefütterten, unbehandelten, männlichen Ratten erhaltenen Ergebnisse zum Insulinabbau sind in der Tabelle 16 und 17 sowie in den Abbildungen 8 und 9 zusammengefaßt.

Der in Tabelle 16 angegebene Insulinschwund ist jeweils auf die Insulinausgangskonzentration im Perfusionsmedium bezogen.

		Perfusion-GEF Nr.	1	2	3	4	5	6	7
INSULIN-KONZ.	AM	µE/ml	1380	1356	1380	1296	624	240	312
		nMol/l	8,52	8,37	8,52	8,00	3,85	1,48	1,93
		%	100	100	100	100	100	100	100
INSULIN - SCHWUND	1.DL	µE/ml	504	372	264	336	270	120	168
		nMol/l	3,11	2,30	1,63	2,07	1,66	0,74	1,04
		%	36,5	27,4	19,1	25,9	43,3	50,0	53,8
	2.DL	µE/ml	720	558	504	600	408	180	240
		nMol/l	4,45	3,44	3,11	3,70	2,52	1,11	1,49
		%	52,2	41,2	36,5	46,3	65,4	75,0	76,9
	3.DL	µE/ml	900	744	732	726	444	204	264
		nMol/l	5,56	4,59	4,52	4,48	2,74	1,26	1,63
		%	65,2	54,9	53,0	56,0	71,2	85,0	84,6
	4.DL	µE/ml	1044	888	840	840	522	240	288
		nMol/l	6,46	5,48	5,19	5,19	3,72	1,48	1,78
		%	75,7	65,5	60,9	64,8	83,7	100	92,3

Tab. 16: Insulinabbau in der Leber gefütterter Ratten

Leberperfusionen - Gef: gefütterte Ratten, unbehandelt

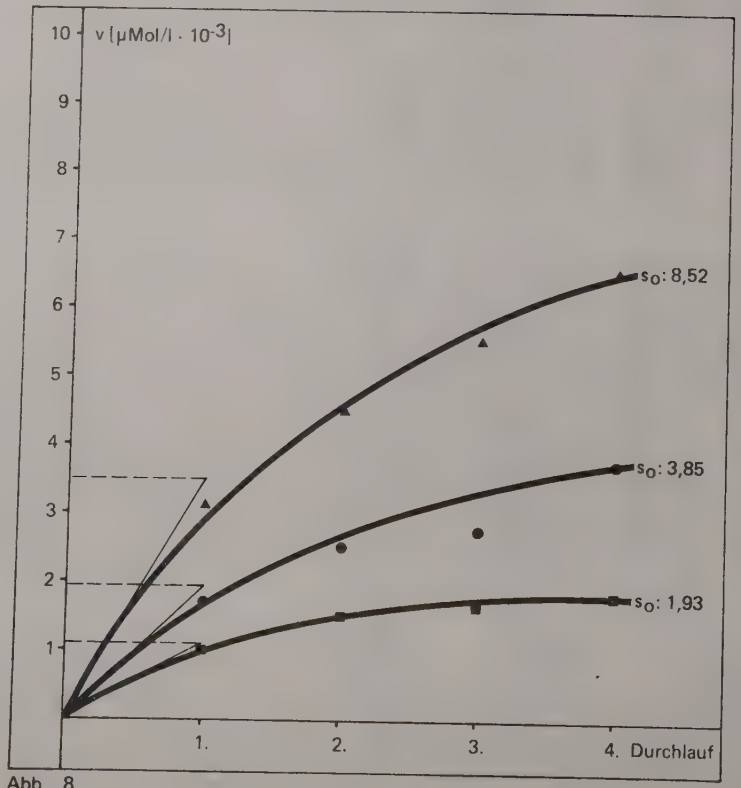


Abb. 8

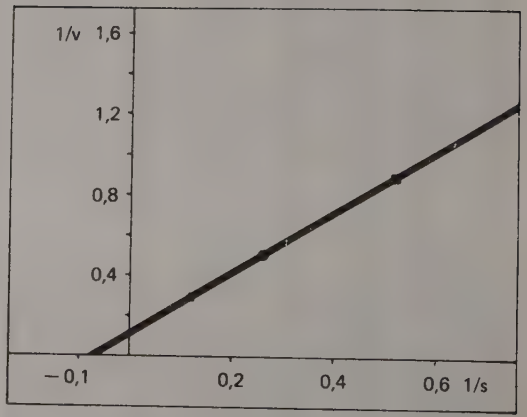


Abb. 9

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
8,52	0,117	3,50	0,285
3,85	0,260	1,97	0,507
1,93	0,518	1,14	0,877

$V_{max} = \frac{1}{0,118} = 8,47$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 1372 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0,080} = 12,50$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 2025 µE Insulin/ml

Tab. 17

Die Leber der gefütterten männlichen Ratte baut maximal in 5 Minuten etwa 8 nMol Insulin/l, entsprechend 8 pMol Insulin/ml ab. Pro g Lebergewebe und pro Minute beträgt der Insulinabbau demnach ca. 0,2 pMol, das ist 1 ng Insulin.

3.3.3 Insulinabbau der Leber von 96 Std. nüchterner, unbehandelter Ratten

Die in 6 Einzelversuchen erhaltenen Ergebnisse zum Insulinabbau sind in Tabelle 18 und 19 sowie in den Abbildungen 10 und 11 zusammengefaßt.

Perfusion-96^{h} Nr.			1	2	3	4	5	6
INSULIN-KONZ.	AM	µE/ml	1260	1116	984	3426	2154	2070
		nMol/l	7,78	6,89	6,07	21,15	13,29	12,77
		%	100	100	100	100	100	100
INSULIN-SCHWUND	1.DL	µE/ml	516	348	270	984	336	744
		nMol/l	3,19	2,15	1,66	6,08	2,07	4,59
		%	40,9	31,2	27,4	28,7	15,6	35,9
	2.DL	µE/ml	660	504	432	1926	648	882
		nMol/l	4,08	3,11	2,66	11,34	4,00	5,44
		%	52,4	45,2	43,9	56,2	30,1	42,6
	3.DL	µE/ml	822	624	534	2316	888	1062
		nMol/l	5,08	3,85	3,29	14,30	5,48	6,55
		%	65,2	55,9	54,4	67,6	41,2	51,3
	4.DL	µE/ml	900	720	624	2478	1032	1248
		nMol/l	5,56	4,45	3,85	15,30	6,37	7,70
		%	71,4	64,5	63,4	72,3	47,9	60,3

Tab. 18

Leberperfusionen - 96h : 96 Std. nüchterne Ratten, unbehandelt

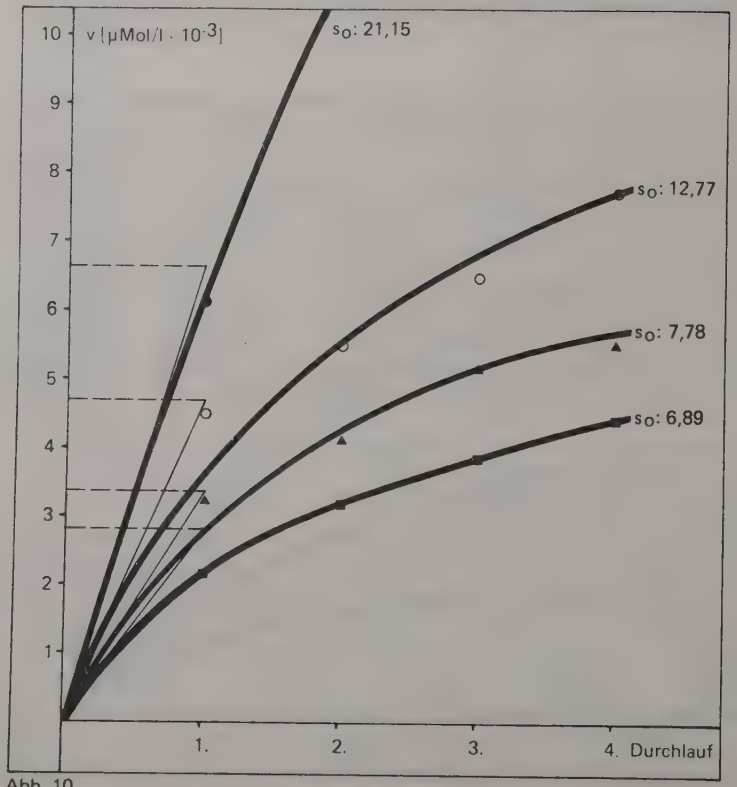


Abb. 10

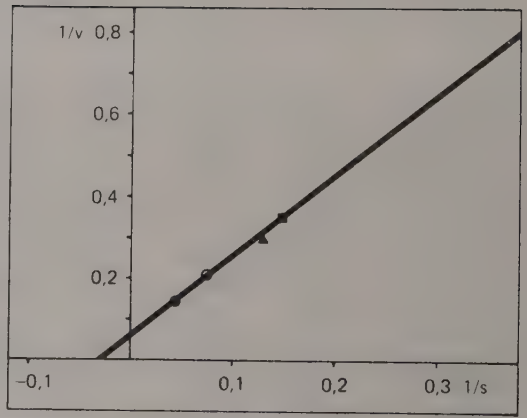


Abb. 11

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
21,15	0,047	6,60	0,151
12,77	0,078	4,70	0,212
7,78	0,128	3,34	0,299
6,89	0,145	2,85	0,350

$V_{max} = \frac{1}{0{,}061}$ = 16,39 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 2655 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0{,}031}$ = 32,25 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 5225 µE Insulin/ml

Tab. 19

Wie aus der vorstehenden Tabelle 11 hervorgeht, baut die Leber der 96 Std. nüchternen Ratte in 5 Minuten etwa 16 nMol Insulin/l ab, entsprechend etwa 16 pMol Insulin/ml. Pro g Feuchtgewicht und pro Minute beträgt der Insulinabbau ca. 0,4 pg.

Die unter 3.3.1 - 3.3.3 aufgeführten Ergebnisse der Leberperfusionsversuche zeigen, daß offensichtlich unter den hier benutzten Perfusionsbedingungen die Fähigkeit der Rattenleber zum Insulinabbau durch länger dauernden Nahrungsentzug (96 Std.) erhöht wird.

Im Gegensatz dazu ist bei nur 24 Std. nüchternen Ratten im Vergleich zu gefütterten Ratten ein vermehrter Insulinabbau noch nicht zu beobachten. In der Abbildung 12 sind anhand der graphisch ermittelten V_{max}- und K_m-Werte die theoretischen Insulinabbaukurven der drei Versuchsgruppen konstruiert.

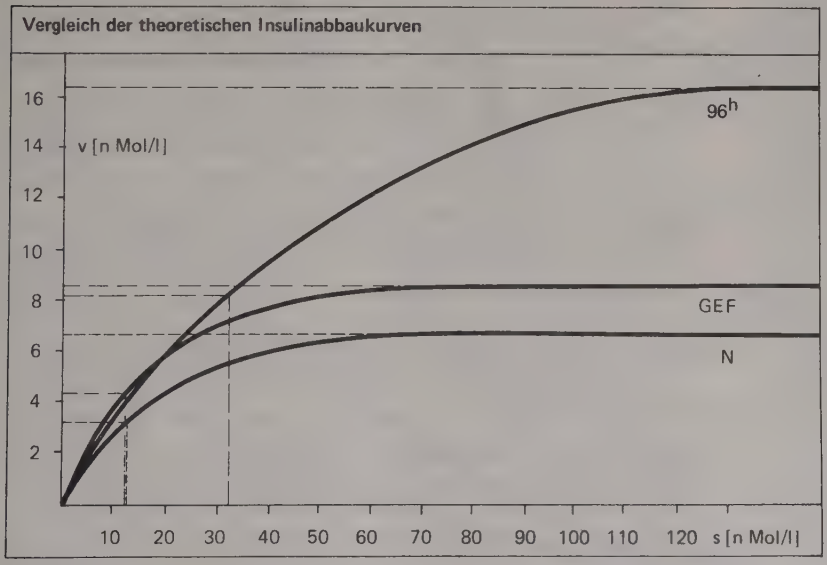


Abb. 12

3.3.4 Insulinabbau in der Leber adrenalektomierter Ratten

Der vermehrte Insulinabbau durch die isoliert perfundierte Leber der 96 Std. nüchternen Ratte legte die Vermutung nahe, den unter diesen Bedingungen erhöhten Insulinabbau auf die ausgeprägte Stress-Situation und der dadurch bedingten Stimulation der Nebennierenfunktion der Hunger-Tiere zurückzuführen.

Die Untersuchungen an der Leber adrenalektomierter Ratten, die Meßergebnisse sind in Abb. 13 und 14 sowie Tab. 20 und 21 zusammengefaßt, zeigen überraschenderweise, daß trotz der Ausschaltung der Nebennierenhormone der Insulinabbau durch Adrenalektomie sehr stark erhöht war.

	Perfusion-AE Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
INSULIN-KONZ.	AM µE/ml	3360	2892	3156	1190	1043	875	1242	931	833
	nMol/l	20,7	17,9	19,5	7,34	6,44	5,40	7,67	5,75	5,14
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100
INSULIN-SCHWUND	1.DL µE/ml	1152	708	852	483	364	270	528	322	294
	nMol/l	7,11	4,38	5,24	2,98	2,25	1,67	3,26	1,99	1,81
	%	34,3	24,5	27,0	40,6	34,9	30,8	42,5	34,6	35,3
	2.DL µE/ml	1728	1068	1788	756	476	469	626	441	364
	nMol/l	10,7	6,60	11,0	4,67	2,95	2,89	3,87	2,73	2,25
	%	51,4	36,9	56,7	63,5	45,6	53,6	50,4	47,4	43,7
	3.DL µE/ml	2160	1620	2256	991	637	648	770	560	497
	nMol/l	13,3	10,0	13,9	6,12	3,93	4,00	4,76	3,46	3,07
	%	64,3	56,0	79,5	88,2	61,0	74,1	61,9	60,1	59,6
	4.DL µE/ml	2260	1884	2594	1137	770	749	878	686	595
	nMol/l	13,9	11,6	15,2	7,02	4,75	4,62	5,42	4,24	3,67
	%	67,3	65,1	82,2	95,5	73,8	85,6	70,7	73,7	71,4

Tab. 20

Leberperfusionen - AE: adrenalektomierte Ratten, 24 Std. nüchtern

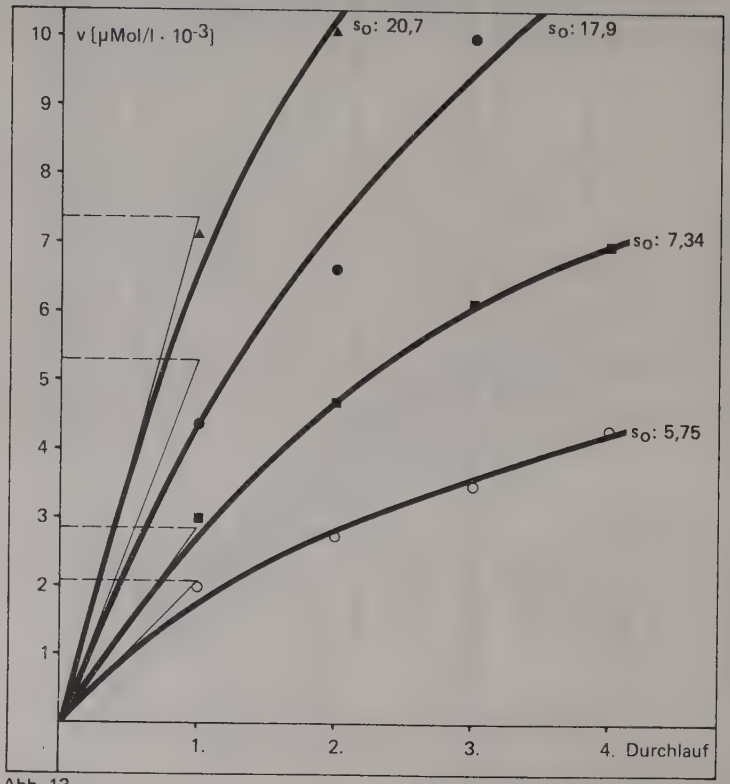


Abb. 13

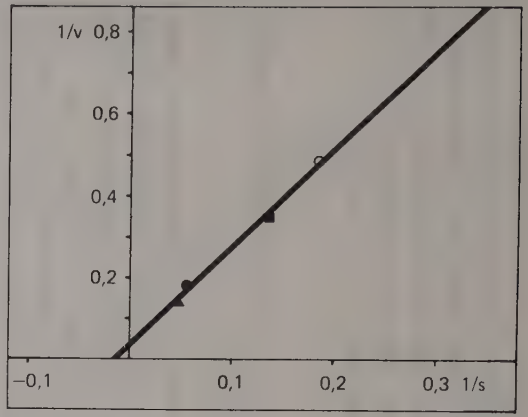


Abb. 14

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}

s_o	$1/s_o$	v	1/v
20,70	0,048	7,33	0,137
17,90	0,055	5,30	0,188
7,34	0,136	2,82	0,355
5,40	0,185	2,05	0,488

$V_{max} = \frac{1}{0{,}032}$ = 31,25 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 5062,5 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0{,}013}$ = 76,92 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 12461,5 µE Insulin/ml

Tab. 21

Der nach Lineweaver-Burk graphisch ermittelte maximale Insulinschwund in der isoliert perfundierten Leber adrenalektomierter Ratten beträgt ca. 30 nMol Insulin/l, entsprechend ca. 30 pMol Insulin/ml. Pro g Lebergewicht und pro 5 Minuten werden demnach durch die Leber adrenalektomierter Ratten ca. 0,6 pMol Insulin abgebaut, das sind 3 ng Insulin.

3.3.4.1 Insulinabbau in der Leber substituierter, adrenalektomierter Ratten

Die Abhängigkeit des Insulinabbaus in der Rattenleber von der Funktion der Nebenniere wurde durch die Ergebnisse einer weiteren Versuchsreihe deutlich, in der die Tiere sofort nach Adrenalektomie bis zur Durchführung der Perfusion am 5. Tag mit dem synthetischen Corticoid Fluocortolon und Suprarenin substituiert wurden (Dosierung: 1 x täglich 0,2 mg Fluocortolon sc. und 2 x täglich 0,15 mg Suprarenin sc., siehe auch unter 2.5.1).

Perfusion-AE-FS Nr.			1	2	3	4	5	6
INSULIN-KONZ.	AM	µE/ml	1584	1331	1584	1485	1518	1199
		nMol/l	9,77	8,21	9,77	9,16	9,37	7,40
		%	100	100	100	100	100	100
INSULIN-SCHWUND	1.DL	µE/ml	242	242	264	473	374	308
		nMol/l	1,49	1,49	1,62	2,91	2,31	1,91
		%	15,27	18,18	16,67	31,85	24,64	25,69
	2.DL	µE/ml	649	704	616	528	748	418
		nMol/l	4,00	4,34	3,80	3,25	4,62	2,58
		%	40,97	52,89	38,89	35,55	59,28	34,86
	3.DL	µE/ml	1034	770	968	858	891	572
		nMol/l	5,98	4,75	5,97	5,29	5,50	3,53
		%	65,27	57,85	61,11	57,78	58,70	47,71
	4.DL	µE/ml	1172	847	1088	968	957	869
		nMol/l	7,23	5,22	6,72	5,97	5,91	5,37
		%	73,98	63,64	68,09	65,19	63,04	72,48

Tab. 22

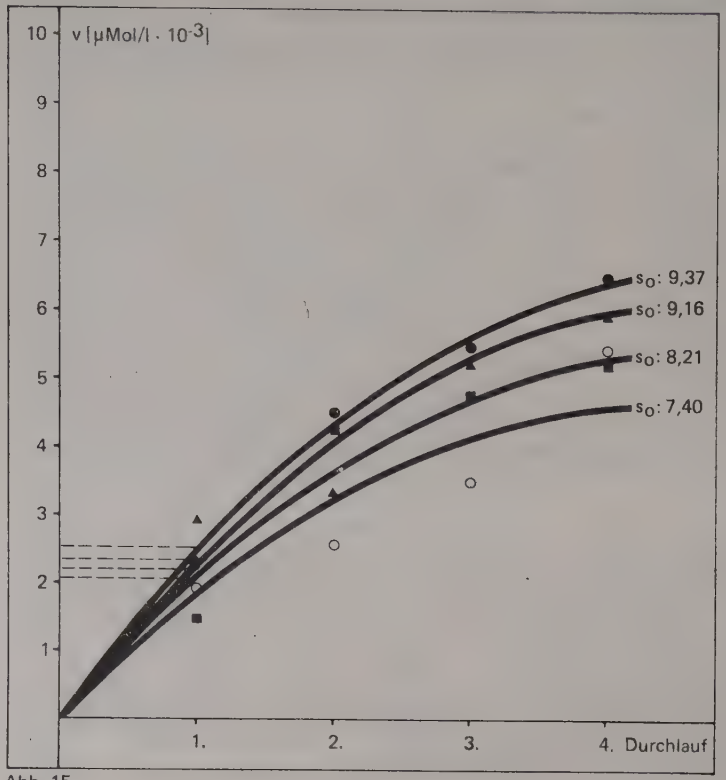


Abb. 15

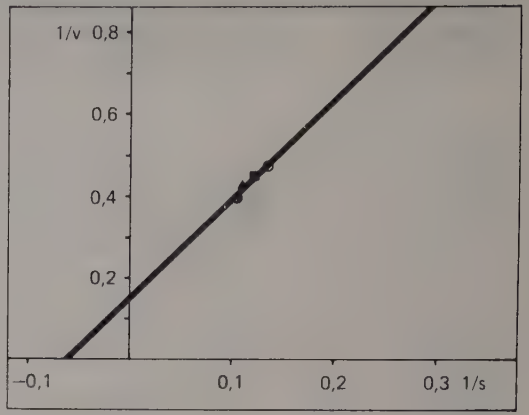


Abb. 16

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
9,37	0,106	2,53	0,395
9,16	0,109	2,34	0,422
8,21	0,122	2,20	0,454
7,40	0,135	2,10	0,476

$V_{max} = \frac{1}{0,147} = 6,80$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 1101,9 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0,060} = 16,66$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 2698,9 µE Insulin/ml

Tab. 23

Wie aus den Tabellen 22 und 23 und den Abbildungen 15 und 16 hervorgeht, wird der bei Adrenalektomie sehr stark erhöhte Insulinabbau durch Vorbehandlung der Ratten mit Fluocortolon und Suprarenin wieder normalisiert. Der maximale Insulinabbau beträgt etwa 7 nMol Insulin/l pro 5 Minuten, entsprechend ca. 7 pMol Insulin/ml.

3.3.4.2 Insulinabbau in der Leber adrenalektomierter Ratten nach Substitution mit Fluocortolon

Zur Klärung der Frage, ob für den erhöhten Insulinabbau nach Adrenalektomie der Ausfall der Funktion der Nebennierenrinde (Corticoide) oder aber der Ausfall des Nebennierenmarks (Adrenalin) verantwortlich ist, wurden die Tiere unmittelbar nach Entfernung der Nebennieren bis zum Versuchstag nur mit dem Corticoid Fluocortolon substituiert. (1 x täglich 0,2 mg Fluocortolon sc.). Dabei zeigte sich, daß für die unter der kombinierten Behandlung mit Fluocortolon und Suprarenin beobachtete Normalisierung des Insulinabbaus offensichtlich das Corticoid verantwortlich ist.

Perfusion-AE-F Nr.			1	2	3	4	5	6
INSULIN-KONZ.	AM	µE/ml	4146	3960	1064	1421	1533	826
		nMol/l	26,21	24,44	6,57	8,77	9,46	5,10
		%	100	100	100	100	100	100
INSULIN-SCHWUND	1.DL	µE/ml	1012	462	308	378	602	133
		nMol/l	6,25	2,85	1,90	2,33	3,71	0,82
		%	23,83	11,67	28,95	26,60	39,27	16,10
	2.DL	µE/ml	1188	990	483	651	763	287
		nMol/l	7,33	6,11	2,98	4,02	4,71	1,77
		%	27,98	25,00	45,39	45,81	49,77	34,75
	3.DL	µE/ml	1320	1364	536	805	882	350
		nMol/l	8,15	8,42	3,31	4,97	5,44	2,96
		%	31,08	34,44	50,38	56,65	57,53	42,37
	4.DL	µE/ml	1430	1397	654	885	1001	434
		nMol/l	8,83	8,62	4,04	5,46	6,18	2,68
		%	33,68	35,27	61,47	62,28	65,30	52,54

Tab. 24

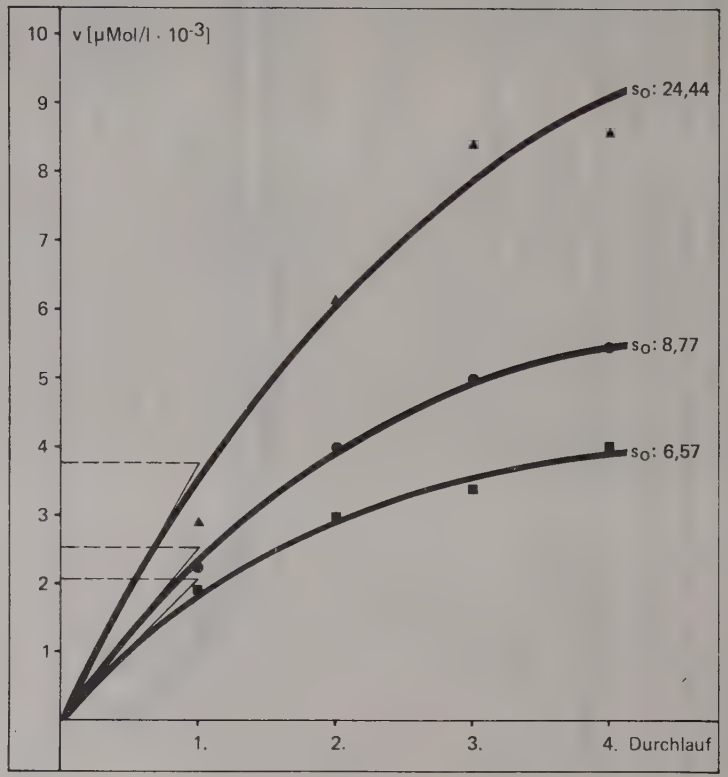


Abb. 17

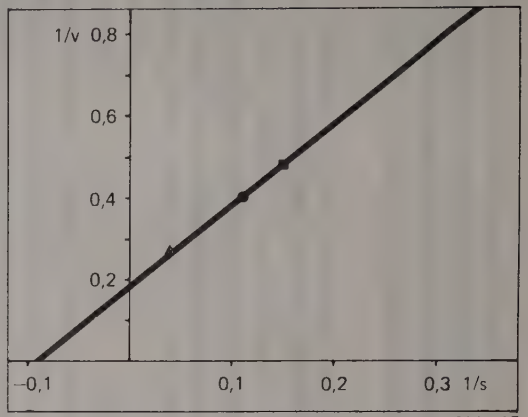


Abb. 18

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
24,44	0,04	3,70	0,270
8,77	0,11	2,47	0,404
6,57	0,15	2,05	0,483

$V_{max} = \frac{1}{0,177}$ = 5,65 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 915,3 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0,088}$ = 11,36 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 1840,9 µE Insulin/ml

Tab. 25

Der aus den Tabellen 24 und 25 sowie den Abbildungen 17 und 18 sich errechnende maximale Insulinabbau adrenalektomierter Ratten unter Substitution mit Fluocortolon entspricht mit ca. 6 nMol Insulin/l dem Abbau unbehandelter normaler Tiere.

In einer weiteren hier nicht im einzelnen wiedergegebenen Versuchsreihe, in der nach Adrenalektomie die Ratten nur mit Suprarenin (siehe unter 2.5.1) substituiert wurden, konnte die vorstehend erwähnte Bedeutung der Corticoide bestätigt werden. Durch alleinige Suprarenin-Substitution konnte der stark erhöhte Insulinabbau in der Leber von adrenalektomierten Ratten nicht beeinflußt werden.

Mit Hilfe der graphisch ermittelten V_{max}- und K_m-Werte des Insulinabbaus in der Leber von 24 Std. nüchternen Ratten (N), adrenalektomierter Ratten unter Substitution mit Fluocortolon und Suprarenin (AE-FS) sowie adrenalektomierter Ratten unter Substitution mit Fluocortolon (AE-F), wurden in Abbilung 19 die jeweiligen Insulinabbaukurven konstruiert.

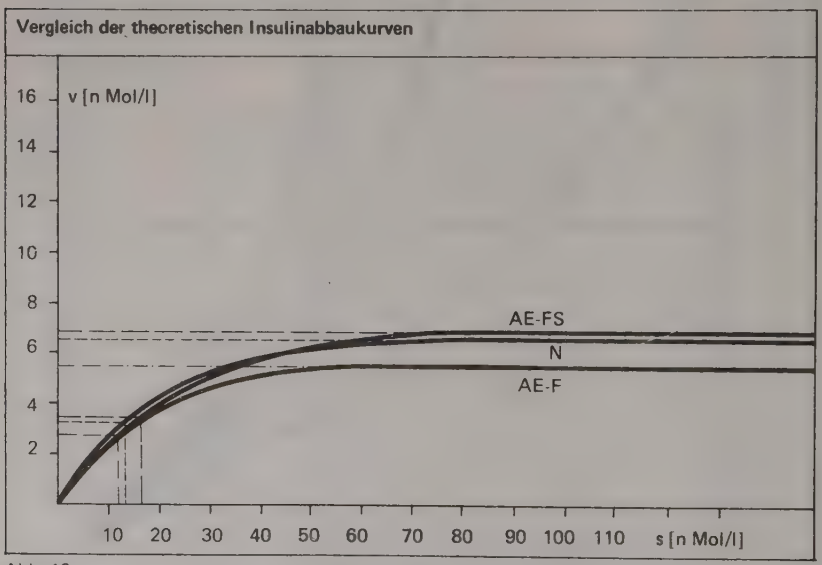


Abb. 19

Aus der vorstehenden Abbildung 19 wird deutlich, daß der Insulinabbau in der Leber adrenalektomierter Ratten durch die Behandlung mit Fluocortolon sowie durch die Substitution mit Fluocortolon und Suprarenin normalisiert wird.

3.3.5 Insulinabbau in der Leber hypophysektomierter Ratten

Aus den vorangehend beschriebenen Versuchen geht hervor, daß offensichtlich Glucocorticoide an der Steuerung des Insulinabbaus in der Leber beteiligt sind.

Zur weiteren Stützung dieser Aussage wurde durch Hypophysektomie der Ratten (siehe unter 2.5.1) die Nebennierenrinde indirekt durch Aufhebung der ACTH-Sekretion ausgeschaltet. Die Perfusionsergebnisse sind in den Tabellen 26 und 27 sowie in den Abbildungen 20 und 21 zusammengefaßt.

PERFUSION-HE Nr.			1	2	3	4	5	6
INSULIN-KONZ.	AM	µE/ml	1038	918	1146	2274	2076	2010
		nMol/l	6,41	5,67	7,07	14,04	12,81	12,40
		%	100	100	100	100	100	100
INSULIN - SCHWUND	1.DL	µE/ml	180	252	360	330	522	513
		nMol/l	1,11	1,56	2,22	2,05	3,22	3,18
		%	17,3	27,5	31,4	14,5	25,1	25,5
	2.DL	µE/ml	318	462	516	480	870	558
		nMol/l	1,97	2,86	3,18	2,97	5,37	3,44
		%	30,6	50,3	45,0	21,1	41,9	27,8
	3.DL	µE/ml	462	498	588	708	1068	648
		nMol/l	2,85	3,08	3,63	4,38	6,59	4,22
		%	44,5	54,2	51,3	31,1	51,4	34,0
	4.DL	µE/ml	648	624	780	859	1224	714
		nMol/l	4,00	3,86	4,81	5,30	7,55	4,41
		%	62,4	68,0	68,0	37,8	59,0	35,5

Tab. 26

Leberperfusionen - HE: hypophysektomierte Ratten, 24 Std. nüchtern

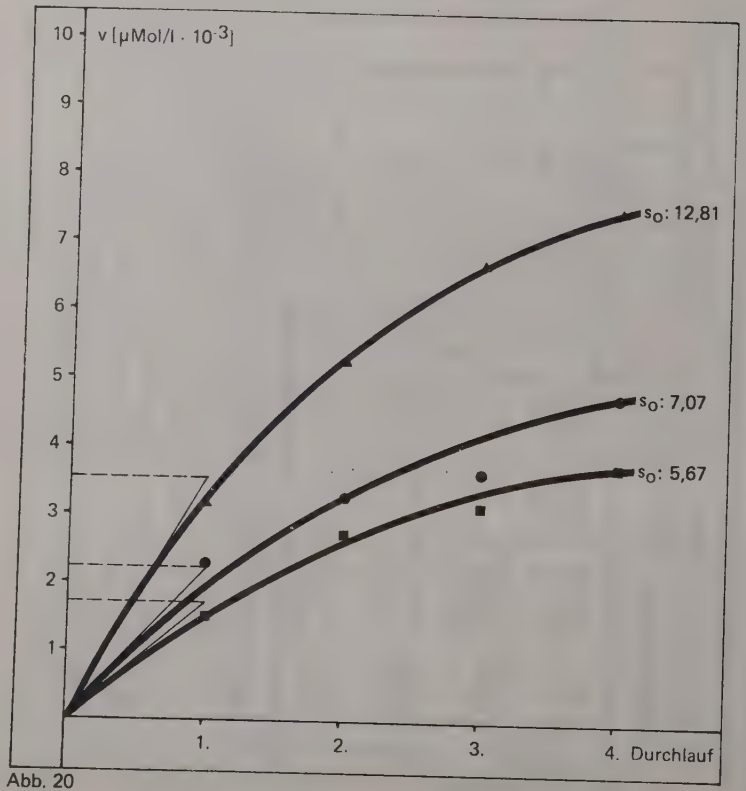


Abb. 20

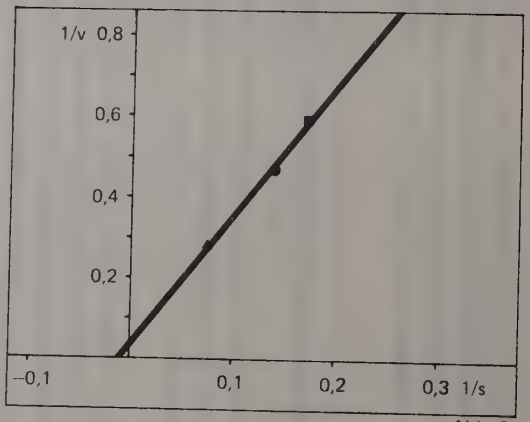


Abb. 21

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
12,81	0,078	3,55	0,282
7,07	0,141	2,15	0,465
5,67	0,176	1,70	0,588

$V_{max} = \frac{1}{0{,}033} = 30{,}30$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 4909 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0{,}011} = 90{,}90$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 14727 µE Insulin/ml

Tab. 27

Auch unter Hypophysektomie konnte wie unter Adrenalektomie ein stark erhöhter Insulinabbau in der isoliert perfundierten Rattenleber beobachtet werden. Aus den vorstehenden Ergebnissen in Tabelle 27 und Abbildung 21 läßt sich ein maximaler Insulinabbau unter Hypophysektomie von ca. 30 nMol Insulin/l bzw. ca. 30 pMol/ml errechnen.

Aus den graphisch ermittelten V_{max}- und K_m-Werten des Insulinabbaus der Leber der hypophysektomierten Ratte, der adrenalektomierten Ratte, der adrenalektomierten Ratte unter Substitution mit Fluocortolon und Suprarenin und der adrenalektomierten Ratten unter Substitution mit Fluocortolon allein, wurden die theoretischen Insulinabbaukurven konstruiert (Abb. 22).

Die Abbildung 22 zeigt, daß bei adrenalektomierten Ratten eine Insulin-Sättigungskonzentration auch mit 100 nMol Insulin/l noch nicht erreicht wurde, und daß durch die Substitution der Tiere mit Fluocortolon und Suprarenin sowie mit Fluocortolon allein der Insulinabbau in der Leber wieder normalisiert wurde.

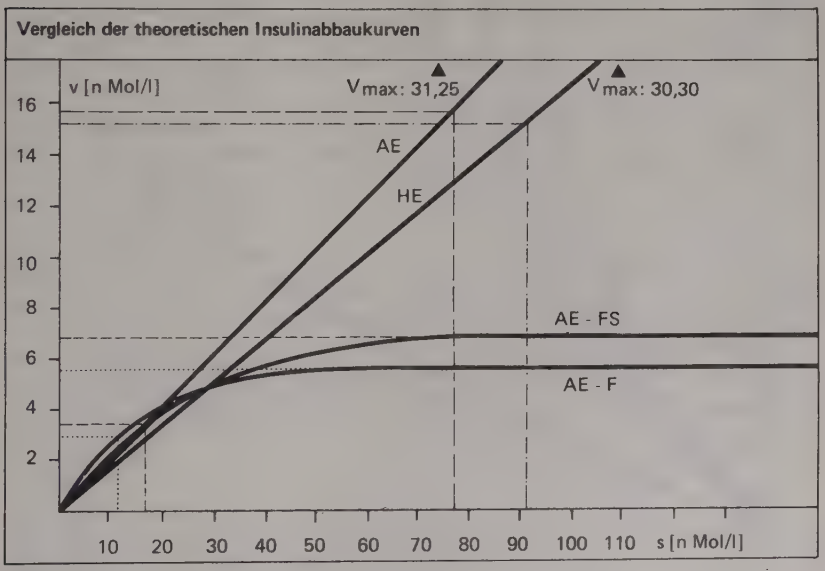


Abb. 22

3.3.6 Insulinabbau in der Leber von Streptozotocin diabetischen Ratten

Das diabetogen wirkende Antibioticum Streptozotocin wird aus Streptomyces achromogenes (108) gewonnen. Nach i.v.-Injektion wirkt es bei der Ratte irreversibel zellschädigend auf die Insulin sezernierenden ß-Zellen des Pankreas.

12 Tage vor Versuchsbeginn wurde den Ratten 80,0 mg Streptozotocin/kg Tiergewicht i.v. appliziert (Vorbehandlung siehe auch unter 2.5.1). Vom dritten bis zum zehnten Tag wurden die Ratten mit Depot-Insulin substituiert.

Die Perfusionsergebnisse sind in den Tabellen 28 und 29 und in den Abbildungen 23 und 24 aufgeführt.

Perfusion-DIAB Nr.			1	2	3	4	5
INSULIN-KONZ.	AM	µE/ml	852	720	576	3360	2472
		nMol/l	5,27	4,44	3,56	20,7	15,3
		%	100	100	100	100	100
INSULIN - SCHWUND	1.DL	µE/ml	372	294	234	648	468
		nMol/l	2,30	1,81	1,45	4,00	2,90
		%	43,6	40,8	40,6	19,3	18,9
	2.DL	µE/ml	552	474	396	1188	936
		nMol/l	3,42	2,92	2,45	7,30	5,81
		%	64,8	65,8	70,7	35,4	37,9
	3.DL	µE/ml	714	624	492	1632	1272
		nMol/l	4,42	3,85	3,04	10,0	7,93
		%	83,8	86,6	85,4	48,6	51,5
	4.DL	µE/ml	804	684	534	2076	1350
		nMol/l	4,97	4,22	3,31	12,8	8,42
		%	94,4	95,0	92,7	61,8	54,6

Tab. 28

Leberperfusionen - Diab: Streptozotocin-diabetische Ratten, 24 Std. nüchtern

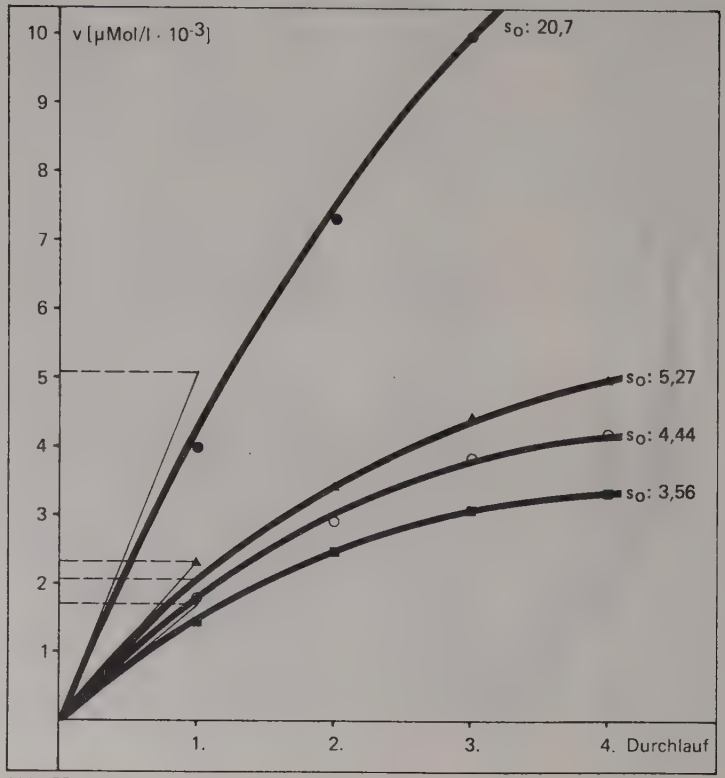


Abb. 23

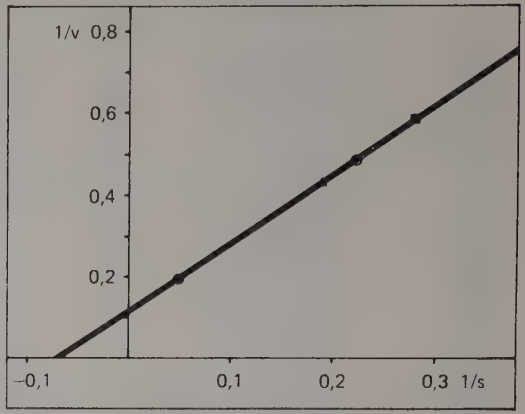


Abb. 24

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
20,70	0,048	5,05	0,198
5,27	0,189	2,30	0,434
4,44	0,225	2,05	0,487
3,56	0,281	1,70	0,588

$V_{max} = \frac{1}{0,119}$ = 8,40 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 1361 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0,072}$ = 13,88 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 2249,9 µE Insulin/ml

Tab. 29

Aus den vorstehenden Insulinmeßergebnissen der Streptozotocin diabetischen Ratten läßt sich ein maximaler Insulinabbau von etwa 8 nMol Insulin/l, entsprechend etwa 8 pMol Insulin/ml, errechnen.

In Abbildung 25 wurden mit Hilfe der graphisch ermittelten V_{max}- und K_m-Werte die theoretischen Insulinabbaukurven der Lebern gefütterter Ratten, diabetischer Ratten und der unbehandelten 24 Std. nüchternen Ratten konstruiert.

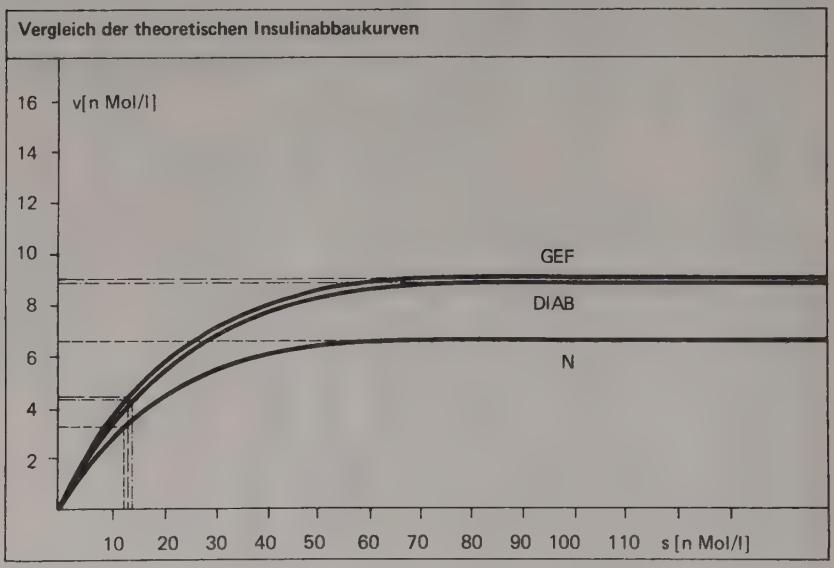


Abb. 25

Aus dem Vergleich der, an der Leber unbehandelter Ratten gewonnenen Ergebnisse zum Insulinabbau, mit dem Insulinabbau in der Leber der diabetischen Ratte folgt, daß trotz der in vivo extrem hohen Blutzuckerkonzentration und der tiefgreifenden Veränderungen im Intermediär-Stoffwechsel der diabetischen Ratte der Insulinabbau nicht verändert ist.

3.3.7 Insulinabbau 24 Std. nüchterner Ratten unter dem Einfluß der oralen Antidiabetica Tolbutamid und Glymidin-Na

MARSHALL und Mitarbeiter (88) zeigten an Leberperfusionsversuchen, daß die Sulfonylharnstoffe Tolbutamid, Tolazamid und Acetohexamid den Insulinabbau gefütterter Ratten signifikant erniedrigten. Aus dieser Beobachtung schlossen sie, daß die Sulfonylharnstoffe neben ihrem stimulierenden Einfluß auf die Insulinsekretion auch hemmend auf den hepatischen Insulinabbau des endogen sezernierten Insulins wirken.

3.3.7.1 Untersuchungen mit Tolbutamid im Hauptperfusionsmedium

Die Rattenleber wurde während der Hauptperfusion mit 20,0 mg Tolbutamid/100 ml Medium diskontinuierlich perfundiert. Vorversuche hatten gezeigt, daß Tolbutamid im stehenden und im gerührten, begasten Medium keinen Einfluß auf die eingesetzte Insulinkonzentration hat. Die Meßergebnisse der durchgeführten Perfusionen sind in den Tabellen 30 und 31 sowie in den Abb. 26 und 27 wiedergegeben.

Perfusion-TOL Nr.			1	2	3	4	5	6
INSU-LIN-KONZ.	AM	µE/ml	2411	2844	1080	1110	528	438
		nMol/l	14,89	17,60	6,67	6,83	3,26	2,71
		%	100	100	100	100	100	100
INSULIN - SCHWUND	1.DL	µE/ml	551	384	204	330	218	162
		nMol/l	3,40	2,41	1,26	2,01	1,35	1,01
		%	22,9	13,5	18,8	29,7	41,3	37,0
	2.DL	µE/ml	707	522	456	504	276	216
		nMol/l	4,37	3,26	2,81	3,09	1,69	1,40
		%	29,3	18,4	42,2	45,4	52,3	49,3
	3.DL	µE/ml	827	1614	636	720	306	318
		nMol/l	5,11	9,99	3,93	4,42	1,95	1,97
		%	34,3	56,8	58,8	64,9	57,9	72,6
	4.DL	µE/ml	839	1760	714	768	468	354
		nMol/l	5,20	10,58	4,41	4,72	2,89	2,19
		%	34,8	60,1	66,1	69,2	88,6	80,8

Tab. 30

Leberperfusionen - TOLB: 24 Std. nüchterne Ratten, unbehandelt, Perfusionsmedium + Tolbutamid

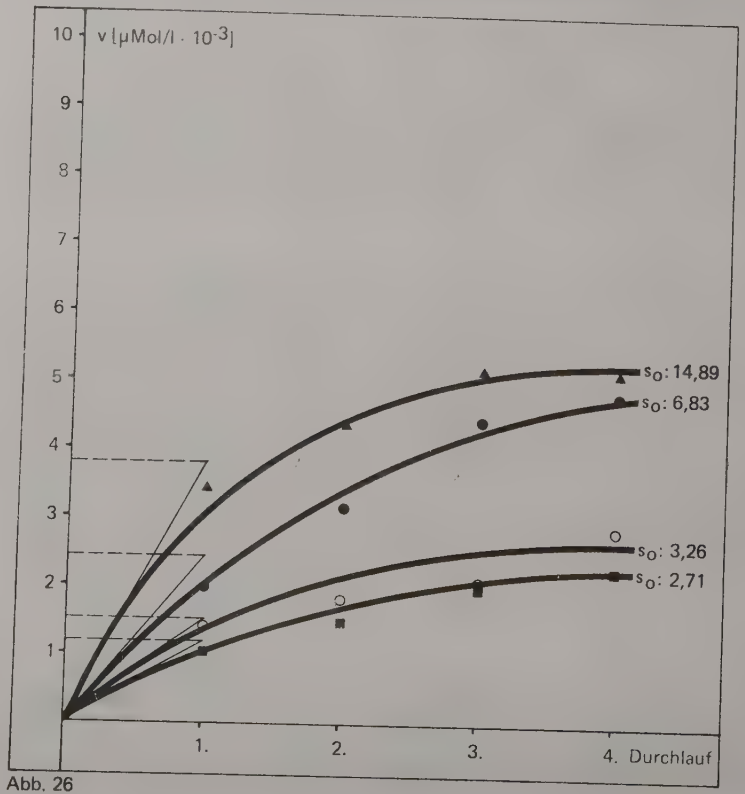


Abb. 26

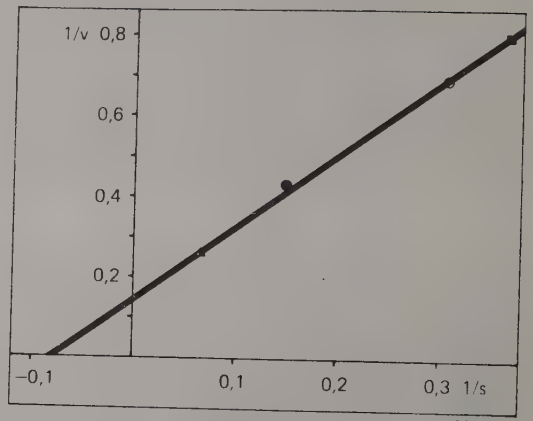


Abb. 27

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
14,89	0,067	3,80	0,263
6,83	0,146	2,37	0,421
3,26	0,306	1,46	0,684
2,71	0,369	1,25	0,800

$V_{max} = \frac{1}{0{,}144}$ = 6,94 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 1124,9 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0{,}080}$ = 12,5 µMol Insulin/l x 10^{-3}
= 2025 µE Insulin/ml

Tab. 31

Wie aus den vorstehenden Meßergebnissen hervorgeht (Tab. 30 und 31, Abb. 26 und 27), läßt sich für die unter Tolbutamid-Zusatz perfundierte Rattenleber ein maximaler Insulinabbau von ca. 7 nMol Insulin/l, entsprechend 7 pMol/ml errechnen.

Die obigen Perfusionsergebnisse zeigen, daß bei Versuchsdurchführung unter Standardbedingungen (siehe 3.2) der gemessene maximale Insulinschwund in Gegenwart von Tolbutamid im Perfusionsmedium im Vergleich zu den an der Leber 24 Std. nüchterner Ratten erhaltenen Meßergebnisse nicht verändert ist.

Um diese von den Ergebnissen von MARSHALL et al. abweichenden Befunde zu prüfen, wurden weitere 10 Leberperfusionen unter Änderung der Standardbedingungen durchgeführt.

3.3.7.2 Leberperfusionsversuche nach MARSHALL mit Tolbutamid im Perfusionsmedium

In Anlehnung an die von MARSHALL beschriebenen Versuchsbedingungen (88) wurden folgende Parameter geändert:

1. Es wurden gefütterte Ratten in den Versuch genommen.
2. Die isolierte Rattenleber wurde kontinuierlich durchströmt (Recycling).
3. Erythrozytenfreies Medium, aber ungleich zu MARSHALL Antibiotica-frei, wurde verwendet.
4. Probenentnahme alle 5 Minuten.

Ein wichtiger Unterschied in der Durchführung der hier beschriebenen Perfusionsversuche zu den von MARSHALL und Mitarbeitern durchgeführten Versuche bestand in dem Versuchsablauf: MARSHALL perfundierte die Rattenleber nach gleicher Vorperfusionszeit 60 Minuten mit insulinhaltigem Medium und danach die gleiche Leber 60 Minuten mit Insulin- und Tolbutamid-haltigem Medium. D. h. MARSHALL vergleicht die Insulinabbaugeschwindigkeiten auch unter Änderung der Versuchsanordnung an ein und

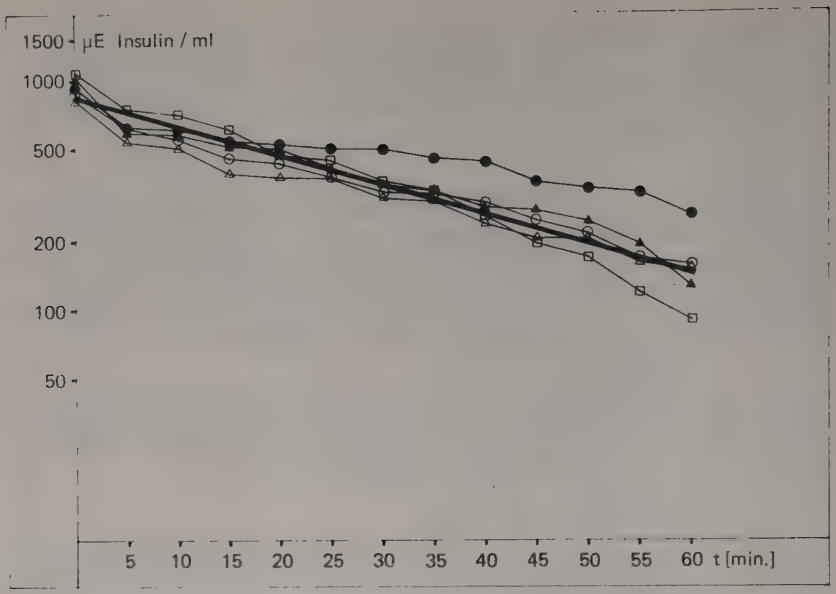


Abb. 28: Meßergebnisse von 5 Leberperfusionen ohne Tolbutamid im Medium. Insulinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit (t)

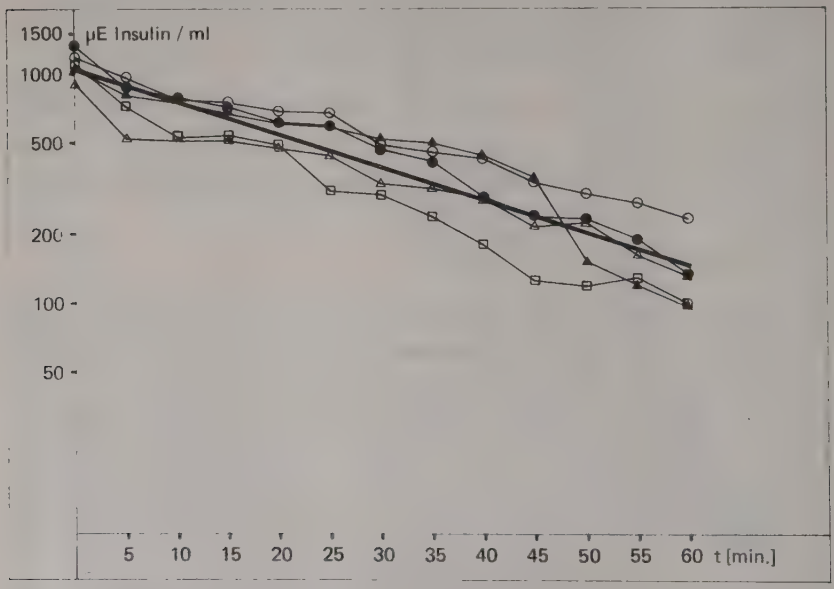


Abb. 29: Meßergebnisse von 5 Leberperfusionen unter Zusatz von Tolbutamid im Perfusionsmedium. Insulinkonzentration in Abhängigkeit von der Perfusionszeit (t)

derselben Rattenleber.

Dieser Versuchsaufbau wurde insofern geändert, als daß der Insulinabbau von 5 Rattenlebern, perfundiert mit Insulin-haltigem Medium, und 5 Rattenlebern, perfundiert mit Insulin- und Tolbutamid-haltigem Medium, verglichen wurde.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 28 und 29 halblogarithmisch dargestellt. Aus dem Vergleich der Mittelwertskurven geht hervor, daß durch den Tolbutamid-Zusatz zum Perfusionsmedium der Insulinabbau in der isoliert perfundierten Rattenleber nicht beeinflußt wird. Dieses aus der graphischen Darstellung bereits ersichtliche Ergebnis wurde durch die biostatistische Auswertung der Ergebnisse auch bestätigt.

3.3.7.3 Untersuchungen mit Glymidin-Na im Perfusionsmedium

	Perfusion-RED Nr.		1	2	3	4	5	6	7
INSULIN-KONZ.	AM	µE/ml	960	876	924	1152	1572	1440	2790
		nMol/l	5,93	5,41	5,70	7,11	9,70	8,99	17,22
		%	100	100	100	100	100	100	100
INSULIN-SCHWUND	1.DL	µE/ml	348	276	324	228	396	264	690
		nMol/l	2,15	1,71	2,00	1,41	2,44	1,73	4,26
		%	36,3	31,5	35,1	19,8	25,2	18,3	24,7
	2.DL	µE/ml	570	408	546	324	720	504	1038
		nMol/l	3,52	2,52	3,37	2,00	4,44	3,21	6,41
		%	59,4	46,6	59,1	28,1	45,8	35,0	27,2
	3.DL	µE/ml	720	516	636	480	1104	732	1392
		nMol/l	4,45	3,19	3,92	2,86	6,81	4,62	8,59
		%	75,0	58,9	68,8	41,6	70,2	50,8	49,9
	4.DL	µE/ml	768	600	772	648	1392	1032	1644
		nMol/l	4,74	3,71	4,76	4,00	8,59	6,47	10,15
		%	80,0	68,5	83,5	56,3	88,5	71,6	58,9

Tab. 32: Insulinmeßergebnisse von 7 Leberperfusionen unter dem Zusatz von Glymidin-Na im Perfusionsmedium

Leberperfusionen · RED: 24 Std. nüchterne Ratten, unbehandelt, Perfusionsmedium + Glymidin-Na (Redul®)

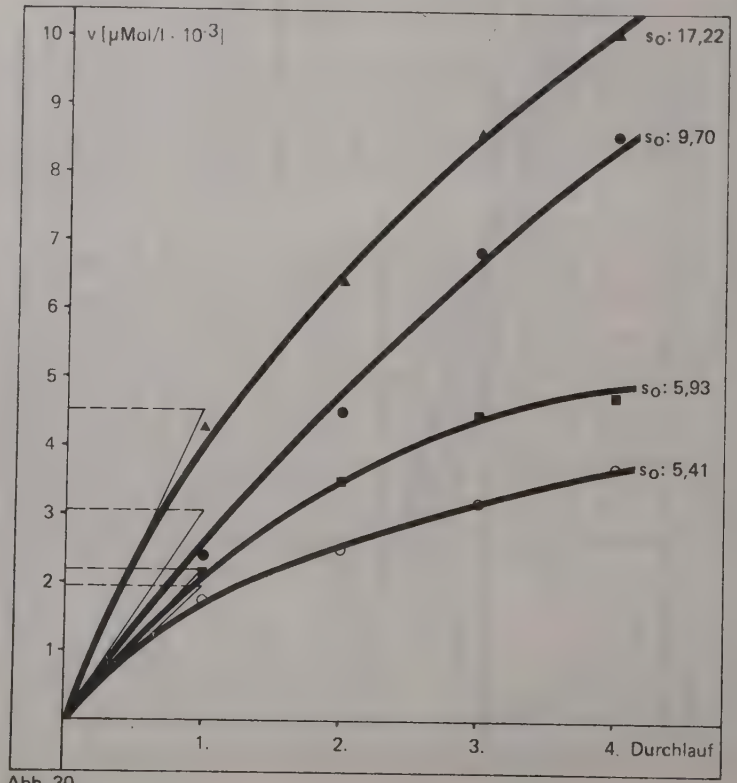


Abb. 30

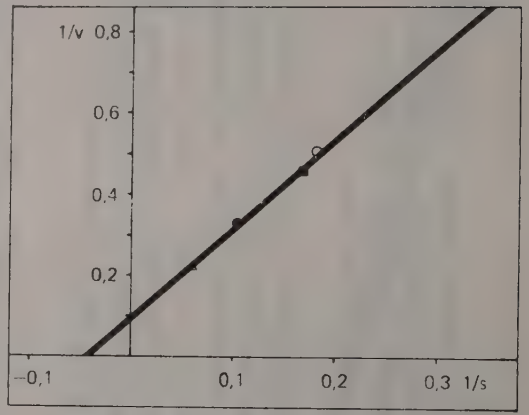


Abb. 31

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
17,22	0,058	4,50	0,222
9,70	0,103	3,05	0,327
5,93	0,168	2,20	0,455
5,41	0,184	1,95	0,512

$V_{max} = \frac{1}{0{,}094} = 10{,}64$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 1723 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0{,}042} = 23{,}81$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 3857 µE Insulin/ml

Tab. 33

Wie unter Tolbutamidzusatz (siehe unter 3.3.7.1, Seite 87) betrug auch in dieser Versuchsreihe die Konzentration im Perfusionsmedium 20,0 mg Glymidin-Na/100 ml Medium.

Die Perfusionsergebnisse sind in den voranstehenden Tabellen 32 und 33 sowie in den Abbildungen 30 und 31 zusammengefaßt.

Die Meßergebnisse zeigen, daß unter dem Zusatz von 20,0 mg% Glymidin-Na zum Hauptperfusionsmedium ein maximaler Insulinabbau von etwa 11,0 nMol Insulin/l beobachtet werden konnte, entsprechend 11 pMol/ml wurden von der Leber in 5 Minuten abgebaut.

Daraus folgt, daß unter dem Zusatz von Tolbutamid weder eine Hemmung noch eine Steigerung des Insulinabbaus beobachtet werden konnte, daß aber unter dem Zusatz von Glymidin-Na im Perfusionsmedium bei Untersuchungen am Modell der isoliert perfundierten Rattenleber eher eine Erhöhung des maximalen Insulinabbaus im Vergleich zu dem Insulinabbau der 24 Std. nüchternen Ratten angedeutet ist.

Um die oben angeführten Meßergebnisse anschaulich darzustellen, wurden aus den graphisch ermittelten V_{max}- und K_m-Werten die theoretischen Insulinabbaukurven gezeichnet, siehe Abb. 32.

Die Abb. 32 zeigt, daß weder Tolbutamid noch Glymidin-Na in einer Konzentration von 20,0 mg% im Perfusionsmedium den Insulinabbau in der isoliert perfundierten Leber der 24 Std. nüchternen Ratten hemmen. Unter dem Einfluß von Glymidin-Na ist eher eine geringe Steigerung des Insulinabbaus angedeutet.

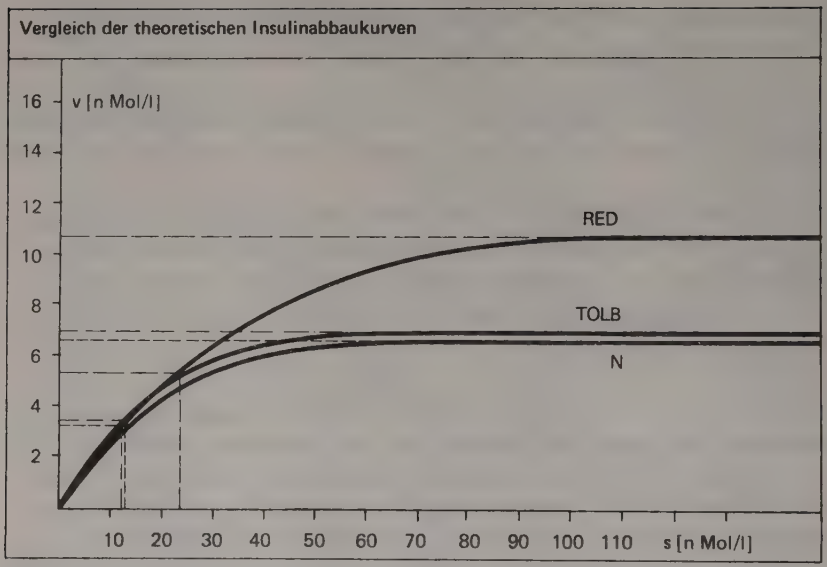


Abb. 32

3.3.8 Insulinabbau in der Leber 24 Std. nüchterner Ratten unter dem Einfluß von Glucagon im Perfusionsmedium

Glucagon wird in den A-Zellen des Pankreas gebildet. Im Gegensatz zum Insulin erhöht dieses Hormon den Blutzuckerspiegel regulativ über die Glykogenolyse in der Leber,um den Organismus z.B. vor einer drohenden Hypoglykämie zu schützen. Über den Blutzuckeranstieg wirkt das Glucagon indirekt stimulierend auf die Insulinsekretion.

Um einen möglichen Einfluß des Glucagons auf den Insulinabbau in der Leber zu untersuchen, wurde die isoliert perfundierte Leber von 24 Std. nüchternen Ratten mit Glucagon-haltigem Vor- und Hauptperfusionsmedium durchströmt. Die Glucagonkonzentration richtete sich nach der eingesetzten Insulinmenge. Die Molarität des Glucagons war jeweils um den Faktor 100 größer als die des Insulins.

Die Versuchsergebnisse der durchgeführten Leberperfusionen sind in den Tabellen 34 und 35 und in den Abbildungen 33 und 34 aufgeführt.

Perfusion-GLU Nr.		1	2	3	4	5
INSULIN-KONZ.	AM					
	µE/ml	900	1104	2208	2101	3344
	nMol/l	5,56	6,81	3,63	13,00	20,64
	%	100	100	100	100	100
INSULIN-SCHWUND	1.DL					
	µE/ml	48	204	432	583	451
	nMol/l	0,30	1,25	2,67	3,63	2,78
	%	5,33	18,48	19,57	27,75	13,49
	2.DL					
	µE/ml	276	336	600	682	990
	nMol/l	1,71	2,07	3,70	4,24	6,11
	%	30,66	30,43	27,17	43,46	36,18
	3.DL					
	µE/ml	300	492	1044	913	1210
	nMol/l	1,86	3,03	6,44	5,67	7,47
	%	33,33	44,57	47,28	43,46	36,18
	4.DL					
	µE/ml	600	636	1224	979	1408
	nMol/l	3,71	3,92	7,56	6,07	8,69
	%	66,67	57,61	55,43	46,60	42,11

Tab. 34: Insulinabbau in der Leber von 24 Std. nüchternen Ratten in Gegenwart von Glucagon im Perfusionsmedium

Leberperfusionen - GLU : 24 Std. nüchterne Ratten, unbehandelt, Perfusionsmedium + Glucagon

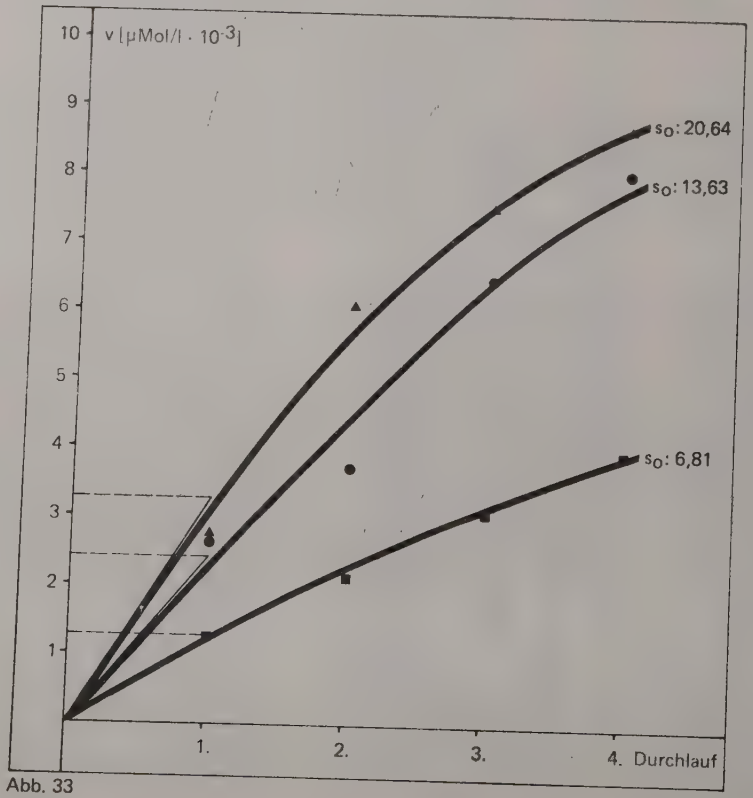


Abb. 33

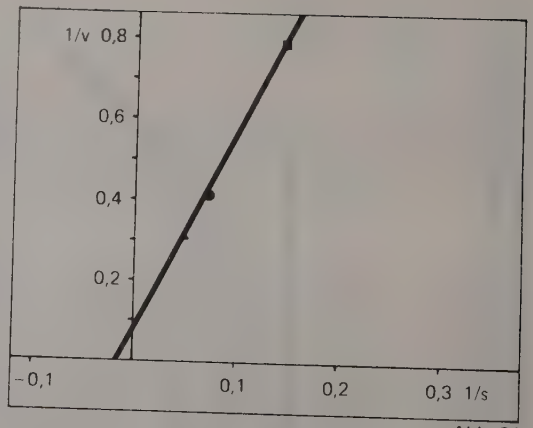


Abb. 34

Angabe in µMol Insulin/l · 10^{-3}			
s_o	$1/s_o$	v	1/v
20,64	0,048	3,21	0,312
13,63	0,073	2,40	0,416
6,81	0,146	1,28	0,781

$V_{max} = \frac{1}{0,077} = 12,98$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 2103,8 µE Insulin/ml

$K_m = \frac{1}{0,017} = 58,82$ µMol Insulin/l x 10^{-3} = 9529,4 µE Insulin/ml

Tab. 35

Der maximale Insulinabbau 24 Std. nüchterner Rattenlebern unter Zusatz von Glucagon im Perfusionsmedium betrug ca. 13 nMol Insulin/l, entsprechend 13 pMol/ml.

Das bedeutet, daß der Insulinabbau in der Leber bei Gegenwart von Glucagon im Medium im Vergleich zu dem der 24 Std. nüchternen Ratten etwa um das Doppelte erhöht ist.

Aus den graphisch ermittelten V_{max}- und K_m-Werten wurden die theoretischen Isulinabbaukurven der oben erwähnten Versuchsgruppen konstruiert, siehe Abbildung 35.

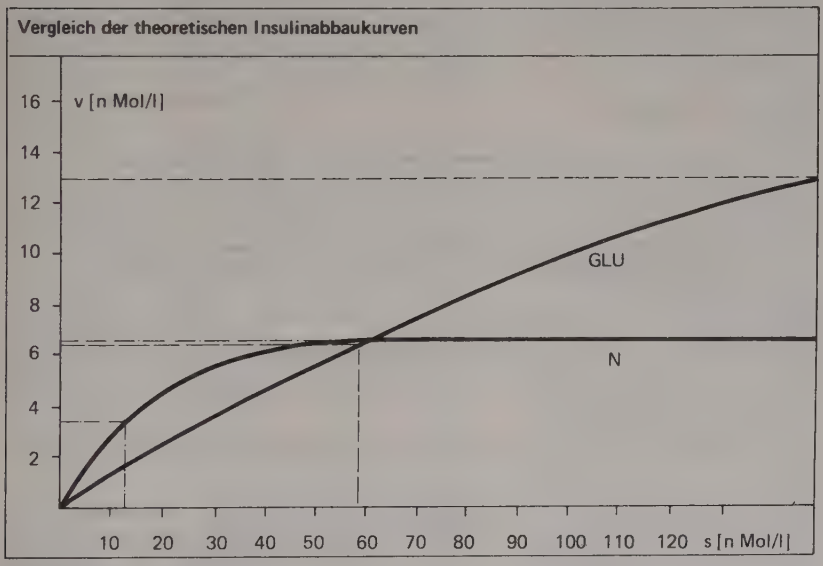


Abb. 35

3.4 Zusammenfassung der nach Lineweaver-Burk graphisch ermittelten, abgerundeten V_{max}- und K_m-Werte der unter verschiedenen biologischen Bedingungen ermittelten Insulinabbaukurven

Versuchsgruppe	V_{max}	K_m
normale Ratten 24 Std. nüchtern	7	13
gefütterte Ratten	8	13
96 Std. nüchterne Ratten	16	32
diabetische Ratten	8	14
hypophysektomierte Ratten	30	91
adrenalektomierte Ratten	31	77
adrenalektomierte Ratten substituiert mit Fluocortolon	6	11
adrenalektomierte Ratten substituiert mit Fluocortolon und Suprarenin	7	17
normale Ratten, 24 Std. nüchtern, Perfusionsmedium und Tolbutamid	7	13
normale Ratten, 24 Std. nüchtern, Perfusionsmedium und Glymidin-Na	11	24
normale Ratten, 24 Std. nüchtern, Perfusionsmedium und Glucagon	13	59

Tab. 36

Die Tabelle 36 zeigt die vorstehend im einzelnen besprochenen Ergebnisse der graphisch ermittelten V_{max}- und K_m-Werte. Bezogen auf die an der Leber normaler und gefütterter Ratten erhaltenen Ergebnisse zum Insulinabbau ist eine deutliche Steigerung des Insulinabbaus in der isoliert perfundierten Leber nur bei den 96 Std. nüchternen, sowie bei den adrenalektomierten und den hypophysektomierten Tieren erkenntlich.

Die V_{max}-Werte dürften als Ausdruck der Kapazität der perfundierten Leber zum Insulinabbau verstanden werden. Unter biochemischen Gesichtspunkten dürfte den K_m-Werten kaum eine Bedeutung beizumessen sein, da der Insulinabbau an einem quasi intakten Organ und nicht an einem isolierten Enzym ermittelt wurde. Die K_m-Werte dürfen nicht als Ausdruck für die Affinität des insulinabbauenden Enzymsystems zum Insulin gewertet werden.

3.5 Blutzucker- und Leberglykogengehalt von gefütterten, 24 Std. nüchternen, 96 Std. nüchternen, adrenalektomierten, hypophysektomierten und diabetischen Ratten

Es wurden der Blutzucker- und Leberglykogengehalt von jeweils 5 Ratten, die den verschiedenen in dieser Arbeit benutzten in vivo-Bedingungen entsprachen, bestimmt.

Die Meßergebnisse sind in der Abbildung 36 wiedergegeben.

Wie erwartet nimmt der Leberglykogengehalt nach einer 24-stündigen Hungerperiode extrem stark ab, auf Werte, die etwa den der adrenalektomierten und der hypophysektomierten Ratte entsprechen.

Bei den 96 Std. Hungertieren nimmt wie bekannt der Leberglykogengehalt wieder aufgrund der unter diesen Bedingungen gesteigerten Gluconeogenese zu.

Der hochgradige Insulinmangel der diabetischen Ratten bewirkt,

wie erwartet, eine starke Hyperglykämie. Der bezogen auf die hohe Blutzuckerkonzentration relativ geringe Leberglykogengehalt ist Ausdruck für die bekannte gesteigerte Glykogenolyse und die gehemmte Glykogensynthese unter diabetischen Bedingungen.

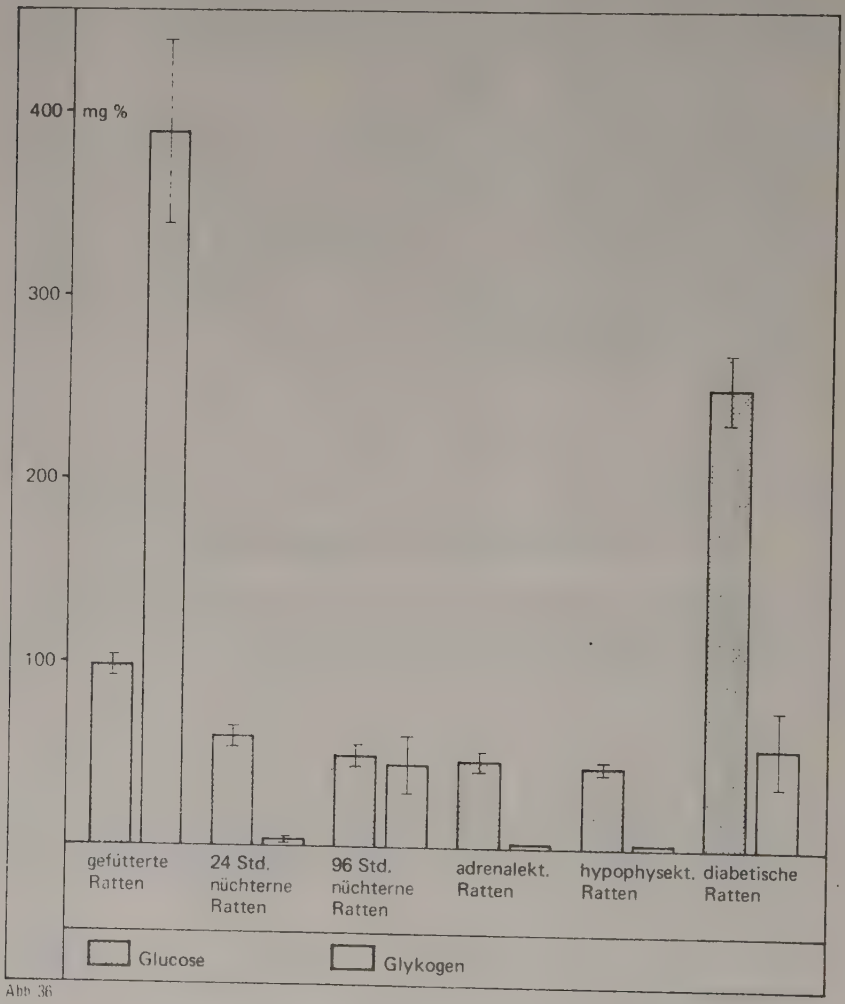


Abb. 36

Abb. 36: Blutzuckerkonzentrationen und Leberglykogengehalte von 6 verschiedenen Versuchsgruppen, n = 6

Unter Berücksichtigung der in Tabelle 36 zusammengefaßten V_{max}-Werte für den Insulinabbau wird deutlich, daß die vor der Perfusion in vivo vorhandene Blutzuckerkonzentration und der Leberglykogengehalt nicht mit dem Insulinabbau in der isoliert perfundierten Leber korreliert sind. So ist z.B. der Insulinabbau der perfundierten Leber der adrenalektomierten Ratte im Vergleich zum Abbau bei der gefütterten Ratte bei relativ niedrigem Blutzuckerspiegel und extrem niedrigem Leberglykogengehalt stark erhöht.

Im Gegensatz dazu ist der Insulinabbau in der Leber der 24 Std. nüchternen Ratte trotz niedriger Blutzuckerwerte und ebenfalls eines extrem niedrigen Leberglykogengehaltes im Vergleich zum Insulinabbau in der Leber der gefütterten Ratte nicht verändert.

Auch die extrem hohe Blutzuckerkonzentration der diabetischen Ratte in vivo führt nicht zu einer Veränderung des in vitro Insulinabbaus in der Perfusion im Vergleich zu gefütterten oder 24 Std. nüchternen Ratten.

Zusammenfassend erlauben diese Befunde den Schluß, daß die in vivo bestandene intermediäre Stoffwechselsituation praktisch keinen Einfluß auf den Insulinabbau der isoliert perfundierten Leber zeigt.

4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine endokrinologische Beeinflussung des Insulinabbaus besteht. In der Einleitung wurde ausführlich gezeigt, daß das Hauptstoffwechselorgan des Insulinabbaus bei Säugern die Leber ist. Um den extrahepatischen Insulinabbau auszuschalten, wurden in der zur Diskussion stehenden Arbeit die Untersuchungen zum Insulinabbau an der isoliert perfundierten Leber der Ratte durchgeführt.

Die meisten der bisher veröffentlichten Untersuchungen zum Insulinabbau wurden mit Homogenaten und/oder Zellfraktionen der Leber verschiedener Spezies durchgeführt. Die isoliert perfundierte Leber wurde bisher nur von wenigen Autoren zu Untersuchungen des Insulinabbaus benutzt (83, 84, 85, 88, 101 - 107). Veröffentlichungen von Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber der Ratte zum Insulinabbau unter verschiedenen endokrinen Zuständen liegen bisher noch nicht vor.

Aus den bisher veröffentlichten Arbeiten über Stoffwechselversuche an der isoliert perfundierten Leber der Ratte geht hervor, daß die verschiedenen Arbeitsgruppen teilweise mit und teilweise ohne Erythrozyten im Perfusionsmedium gearbeitet haben.

In orientierenden Versuchen wurde an einigen empfindlichen Stoffwechselparametern die Funktion der isoliert perfundierten Leber bei Verwendung von erythrozytenhaltigem und erythrozytenfreiem Medium geprüft.

Zur Überprüfung der Funktion der Leberzelle dienten die Lactat- und die Pyruvatkonzentrationen im Perfusionsmedium als Meßgröße des intrazellulären Redox-Zustandes. Der Gehalt an GOT und GPT diente als Meßgröße für die Zellmembranfunktion.

In eingehenden Untersuchungen hatte SCHIMASSEK gezeigt (93), daß eine den physiologischen in vivo Verhältnissen entsprechende, isoliert perfundierte Leber einen L/P-Quotienten von ca. 10 einstellen muß.

Aus den Vorversuchen geht hervor (Seite 36), daß die Benutzung eines erythrozytenhaltigen Perfusionsmediums unbedingt erforderlich ist, um einerseits den intrazellulären Redox-Zustand, gemessen am L/P-Quotienten, den physiologischen Verhältnissen anzupassen und andererseits die Intaktheit der Zellmembran, gemessen am Austritt der Transaminasen in das Perfusionsmedium, aufrechtzuerhalten.

Bei Verwendung eines erythrozytenfreien Mediums steigt der L/P-Quotient im Perfusionsmedium rasch auf Werte über 10 an und zeigt damit, aufgrund des Sauerstoffmangels, einen erhöhten Hydrierungsgrad der isoliert perfundierten Leber an.

Die Vorversuche zeigen, daß offensichtlich auch für die Aufrechterhaltung einer normalen Zellmembranfunktion ein ausreichendes Sauerstoffangebot erforderlich ist. Bereits in früheren Untersuchungen von RANDLE (109, 110) wurde gezeigt, daß die Zellwandfunktion von der oxydativen Phosphorylierung abhängig ist. So wird z.B. bei einer Hemmung der oxydativen Phosphorylierung die Zellmembran der Muskelzelle für Glucose durchgängig, so daß die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung eine Muskelzelle wie ein Insulin-Effekt imponiert. Eine entsprechend erhöhte Permeabilität der Zellmembran der Muskelzelle für Glucose ist auch bei Sauerstoffmangel bekannt.

Auch der, in den Vorversuchen nachgewiesene Austritt der Transaminasen aus der Leberzelle in das Perfusionsmedium bei nicht ausreichendem Sauerstoffangebot (erythrozytenfreies Medium), zeigt, daß die Permeabilität der Zellmembran sehr empfindlich auf hypoxaemische Zustände, im Sinne einer Erhöhung des Transportes durch die Membran der Leberzelle in beide Richtungen, reagiert.

Wenn man, wie in der Einleitung beschrieben wurde, davon ausgeht, daß der enzymatische, initiale Insulinabbau im wesentlichen intrazellulär im Zytoplasma abläuft, muß bei Untersuchungen zum Insulinabbau an der isoliert perfundierten Leber gewährleistet sein, daß die Permeabilität der Leberzelle den physiologischen Bedingungen möglichst weitgehend entspricht.

Für die Bedeutung einer intakten Zellmembran in bezug auf die Geschwindigkeit des Insulinabbaus sprechen die Ergebnisse weiterer Vorversuche, in denen der Insulinschwund an der isoliert perfundierten Leber bei Benutzung von erythrozytenfreiem Medium geprüft wurde. Dabei zeigte sich, daß im Gegensatz zu den Versuchen mit erythrozytenhaltigem Medium die Insulinabbaugeschwindigkeit bis selbst zu extrem hohen Insulinausgangskonzentrationen im Medium (ca. 20.000 µE/ml) linear anstieg. Das heißt, daß selbst bei diesen extrem hohen Insulinkonzentrationen im Perfusionsmedium bei Sauerstoffmangel das insulinabbauende Enzymsystem der Rattenleber noch nicht "gesättigt" ist. Im Gegensatz dazu war bei Anwesenheit von Erythrozyten im Perfusionsmedium, d. h. bei ausreichender Sauerstoffversorgung, das insulinabbauende Enzymsystem der perfundierten Leber bereits bei einer Insulinkonzentration von etwa 1000 µE/ml "gesättigt".

Diese Befunde sprechen dafür, daß die Penetration von Insulin aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum bei intakter Zellmembran einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für den Insulinabbau darstellt.

Weiterhin kann man aus den obigen Befunden schließen, daß bei Sauerstoffmangel nicht nur, wie oben erwähnt, der Einstrom von Glucose, sondern auch der Einstrom des großmolekularen Insulins in die Zelle erhöht ist. Wenn diese Annahme richtig ist, dann würde bei Sauerstoffmangel sowohl der Austritt großmolekularer Proteine (z.B. Transaminasen) als auch der Einstrom großer Moleküle wie das Insulin möglich sein.

In weiteren Voruntersuchungen (Seite 45) wurden orientierende Versuche zu der Frage, ob der Insulingehalt im Perfusionsmedium bei Zusatz von Antibiotica beeinflußt wird, durchgeführt. Bei der Durchführung von Stoffwechseluntersuchungen an der isoliert perfundierten Rattenleber wird von den meisten Arbeitsgruppen dem Perfusionsmedium ein oder mehrere Antibiotica zugesetzt. Wegen der bekannten chemischen Labilität des Insulinmoleküls sowohl gegenüber oxydierenden als auch reduzierenden Verbindungen, wurde die Stabilität des Insulinmoleküls in Gegenwart von Aureomycin oder Penicillin untersucht.

Sowohl unter Perfusionsbedingungen - allerdings ohne Zwischenschaltung einer Leber ("Leer-Perfusion") - als auch unter Rühren im Becherglas, war in Gegenwart von Aureomycin oder Penicillin immunologisch ein sehr starker Insulinschwund nachweisbar. Optisch war bereits während des Inkubationsversuches eine Entfärbung der durch das Aureomycin gelblich gefärbten Lösung unter Ausbildung eines Präzipitates zu erkennen. Mit Hilfe von J^{125}-markiertem Rinder-Insulin konnte, in Gegenwart von Aureomycin, die Ausbildung eines J^{125}-haltigen Präzipitates nachgewiesen werden. Diese interessanten Befunde wurden im Rahmen der als Vorversuche durchgeführten Untersuchungen nicht weiter bearbeitet. Man kann sich aber sehr wohl vorstellen, daß die chemisch labilen und reaktiven Antibiotica Aureomycin und Penicillin mit dem ebenfalls chemisch labilen Insulinmolekül unter Ausbildung eines Präzipitates reagieren. In weiteren, nicht in den Rahmen der vorliegenden Arbeit passenden, Untersuchungen müßten die zur Inaktivierung von Insulin führenden Reaktionen des Insulinmoleküls mit Aureomycin bzw. Penicillin untersucht werden, wobei die Frage im Vordergrund stehen müßte, ob diesen Befunden im Rahmen einer hochdosierten Antibiotica-Dosierung eine klinische Bedeutung zukommt.

Da aus den oben beschriebenen Ergebnissen der Vorversuche deutlich hervorgeht, daß die Stabilität des Insulinmoleküls in Gegenwart eines Antibioticums im Perfusionsmedium nicht gewährleistet ist, sollte, trotz Orientierung an den Ver-

suchsbedingungen anderer Arbeitsgruppen, im Perfusionsmedium auf ein Antibioticum verzichtet werden. Zahlreiche Keimzahlbestimmungen im Perfusionsmedium sowie parallel zur Perfusion durchgeführte Inkubationsversuche zeigten keinen nennenswerten Keimzuwachs. Die Inkubationsversuche bestätigten die Stabilität des Insulinmoleküls im Antibioticum-freien Medium.

Der Vergleich der histologischen Untersuchungen der Lebern einer Kontrollgruppe und der perfundierten Lebern ließ keine lichtoptischen Veränderungen erkennen, die auf die Perfusion hätten zurückgeführt werden können.

Weitere Vorversuche (siehe 3.2) zeigten wie lange eine Rattenleber unter den beschriebenen Versuchsbedingungen perfundiert werden konnte, ohne daß durch eine auftretende Zellschädigung die wahren Werte eines gemessenen Insulinschwundes möglicherweise beeinflußt wurden. Der gemessene Transaminaseanstieg im Perfusionsmedium im 5. Durchlauf einer Leberperfusion sprach für eine Zellmembranschädigung. Daraus folgte, daß die Perfusionsversuche nicht über eine Versuchsdauer von mehr als 4 Durchläufen gehen sollte.

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten, daß das Modell der isoliert perfundierten Rattenleber auch zur Untersuchung des Insulinabbaus angewendet werden kann.

Zur Untersuchung einer möglichen endokrinen Beeinflussung des Insulinabbaus in der Leber der Ratte wurden in vivo verschiedene Zustände mit tiefgreifenden Änderungen des endokrinen Systems der Ratte erzeugt. Unter den unterschiedlichen endokrinen Bedingungen wurde jeweils der Insulinabbau an der isolierten Leber untersucht und mit der an insgesamt 16 Lebern von 24 Std. nüchterner Ratten bestimmten Insulinabbaugeschwindigkeit verglichen.

Die graphisch nach Lineweaver-Burk ermittelte maximale Abbaugeschwindigkeit (V_{max}) des Insulins pro 5 Minuten durch die

isoliert perfundierte Leber der 24 Std. nüchternen Ratten betrug etwa 7×10^{-3} µMol/l Perfusionsmedium. Da das Durchflußvolumen bei der Perfusion in 5 Minuten ca. 50 ml betrug, war die absolute Menge des in 5 Minuten maximal abgebauten Insulins der 20. Teil von ca. 7×10^{-3} µMol, d. h. ca. $0{,}3 \times 10^{-3}$ µMol.

Zur Errechnung, der unter den verschiedenen Bedingungen in 5 Minuten maximal abbaubaren Insulinmengen, sind die im folgenden angegebenen V_{max}-Werte jeweils durch 20 zu dividieren. Durch eine 24 Stunden dauernde Hungerperiode wurde der V_{max}-Wert im Vergleich zu gefütterten Tieren nicht verändert. Unter Berücksichtigung der in Abb. 36 gezeigten Ergebnisse, haben offensichtlich die bei gefütterten und 24 Std. nüchternen Ratten in vivo gemessenen starken Unterschiede der Blutzucker- und Leberglykogenwerte keinen Einfluß auf den Insulinabbau bei der Perfusion.

Bei einem extrem langen Nahrungsentzug von 96 Std. wurde der V_{max}-Wert des Insulinabbaus um den Faktor 2,5 erhöht. Dieser Befund überrascht zunächst, da man davon ausgehen kann, daß während der viertägigen Nüchternperiode im Vergleich zu den gefütterten Tieren sehr viel weniger Insulin in vivo sezerniert wird und zur Leber gelangt. Man könnte erwarten, daß bei niedriger Insulinsekretion und damit bei geringerem Insulinangebot für die Leber auch der Insulinabbau vermindert sein würde. Die hier in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen aber, daß im Gegensatz dazu die isoliert perfundierte Leber nach einer viertägigen Hungerperiode befähigt ist, unter Sättigungsbedingungen Insulin schneller abzubauen als die Leber der gefütterten sowie der 24 Std. nüchternen Ratte.

Durch Adrenalektomie 5 Tage vor Perfusionsbeginn wurde experimentell ein Zustand erzeugt, der im Hinblick auf bestimmte Parameter dem Zustand der Tiere während der 96 Std. dauernden Hungerperiode ähnelt oder gleicht. Dies gilt in erster

Linie für die, durch die niedrige Blutzuckerkonzentration der adrenalektomierten Ratte bedingte, herabgesetzte Insulinkonzentration sowie den, bei den adrenalektomierten Tieren unter in vivo-Bedingungen niedrigen Leberglykogengehalt. Ein wesentlicher Unterschied zwischen 96 Std. nüchternen Tieren und adrenalektomierten Tieren besteht darin, daß bei den nüchternen Ratten zusätzlich zur Basissekretion durch den extremen Hungerstress die Nebennierenfunktion stark erhöht ist, und es unter diesen Bedingungen zu einer vermehrten Corticoid- und Adrenalinsekretion kommt. Ausdruck der vermehrten Corticoidsekretion während der Hungerperiode ist die in Abbildung 36 gezeigte Erhöhung des Leberglykogengehaltes im Vergleich zu dem Leberglykogengehalt der nur 24 Std. nüchternen Tiere.

Der gemessene erhöhte Insulinabbau durch die isoliert perfundierte Leber von 96 Std. nüchternen Ratten steht im Gegensatz zu den in der Einleitung erwähnten Befunden von ELGEE (69), BEYER (19) sowie MORGAN (71, 72), nach denen der Insulinabbau in Leberhomogenaten von hungernden Ratten und Mäusen vermindert war.

Die Untersuchungen an der isoliert perfundierten Leber und die mit Leberhomogenaten durchgeführten Untersuchungen zum Insulinabbau sind aber nicht vergleichbar, da das Homogenat einerseits ein völlig artifizielles System darstellt und da andererseits in den Homogenatversuchen eine extrem hohe Insulinkonzentration eingesetzt wurde. Die so erhaltenen Befunde erlauben keine Rückschlüsse auf die in vivo-Verhältnisse, wobei noch hinzukommt, daß bei Verwendung eines Homogenates die Barrierefunktion der Zellmembran ausgeschaltet ist.

Nach Tabelle 23, Seite 77, wird der Insulinabbau durch die isoliert perfundierte Leber der adrenalektomierten Tiere, gemessen an der Veränderung des V_{max}-Wertes, stark erhöht. Im Vergleich zu den Werten nach einer 24-stündigen Hungerperiode ist der V_{max}-Wert der adrenalektomierten Ratte um den Faktor 5 bis 6 erhöht. Die starke Veränderung des Insulinabbaus durch Adrenalektomie ist offensichtlich durch den Ausfall der

endokrinen Funktion der Nebenniere zurückzuführen, da der Insulinabbau in der Leber von adrenalektomierten Ratten, die mit dem Glucocorticoid Fluocortolon und mit Suprarenin gleichzeitig substituiert waren, wieder normalisiert wurde. D. h. der V_{max}-Wert entsprach unter den genannten Versuchsbedingungen praktisch den an der Leber der gefütterten bzw. 24 Std. nüchternen Ratte erhaltenen Werte.

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigen, daß für die Normalisierung des Insulinabbaus in der Leber der adrenalektomierten Ratte offensichtlich nicht das Adrenalin, sondern vielmehr das Glucocorticoid verantwortlich ist, da durch alleinige Substitution mit Fluocortolon bereits der Insulinabbau völlig normalisiert wird.

Wie zu erwarten war, führte auch die indirekte Ausschaltung der NNR-Funktion durch Hypophysektomie, gemessen am Insulinabbau, zu einem praktisch gleichen Zustand wie die Adrenalektomie. Der Unterschied im Insulinabbau in der Leber von normalen, d.h. gefütterten und 24 Std. nüchternen Tieren auf der einen Seite und von adrenalektomierten bzw. hypophysektomierten Tieren auf der anderen Seite, ist in dem Sinne zu interpretieren, daß durch die operative Ausschaltung der Nebennierenrinde die Kapazität der Leber für den Insulinabbau stark erhöht wird. Dies äußert sich darin, daß erst bei sehr hohen Insulinkonzentrationen eine Sättigung des Insulin-abbauenden Systems der Leber erreicht wird.

Die an der Leber von adrenalektomierten und hypophysektomierten Tieren erhaltenen Ergebnisse entsprechen dem Befund, daß bei der Perfusion mit Erythrozyten-freiem Medium das Insulinabbauende System der perfundierten Leber auch bei extrem hohen Insulinkonzentrationen (10.000 - 20.000 µE/ml) noch nicht gesättigt ist.

Wenn man berücksichtigt, daß Lebergewebe nach Zerstörung der Zellmembran (z.B. Leberhomogenat) einen wesentlich stärkeren Insulinabbau zeigt als z.B. Leberschnitte, dann ist die An-

nahme erlaubt, daß die Permeation des Insulins durch die Membran der Leberzelle einen wesentlichen Faktor darstellt. Dieses würde bedeuten, daß die Membran der Leberzelle eine Barriere darstellt, die das über die Pfortader vom Pankreas zur Leber gelangende Insulin gleichsam vor einem völligen Abbau schützt. Wenn man von dieser Theorie ausgeht, dann liegt die Annahme nahe, daß durch Adrenalektomie das Eindringen von Insulin aus dem extrazellulären Raum in die Leberzelle erhöht wird.

Im Gegensatz zu den deutlichen Veränderungen des Insulinabbaus durch die Leber von adrenalektomierten und hypophysektomierten Ratten war der Insulinabbau in der Leber von Streptozotocin diabetischen Ratten, die nicht mit Insulin substituiert waren, praktisch nicht verändert.

Wenn man davon ausgeht, daß bei diabetischen Tieren im Gegensatz zu den adrenalektomierten, hypophysektomierten und den 96 Std. nüchternen Tieren die Leber in vivo vor Durchführung des Perfusionsversuches sehr hohen Blutglucosewerten ausgesetzt war, und wenn man weiterhin die bei diabetischen Ratten bekannten tiefgreifenden Veränderungen des Intermediärstoffwechsels in der Leber in Betracht zieht, dann muß man folgern, daß weder der in vivo bestandene Blutzuckerspiegel noch die intermediäre Stoffwechselsituation der Leber einen merklichen Einfluß auf den Insulinabbau in der Leber ausüben.

In der Einleitung wurde darauf hingewiesen, daß mehrere Autoren (68, 71, 72, 74) mit Leberhomogenaten alloxandiabetischer Ratten einen verminderten Insulinabbau fanden. Auch diese, wie die bereits oben erwähnten Untersuchungsergebnisse an hungernden Tieren stehen im Gegensatz zu den an der isoliert perfundierten Leber erhaltenen Ergebnisse zum Insulinabbau, nach denen die Leber von Streptozotocin diabetischen Tieren im Vergleich zur Leber der 24 Std. nüchternen Ratte Insulin nicht langsamer, sondern angedeutet schneller abbaut.

Auch hier gilt das bereits bei der Diskussion der widersprüch-

lichen Befunde durch Leberhomogenate und durch die isoliert perfundierte Leber hungernder Tiere Gesagte, daß ein Vergleich der unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse nicht erlaubt ist und, daß den Homogenatversuchen unter den angewandten Versuchsbedingungen kaum eine biologische Relevanz beizumessen ist.

Wie vorstehend erwähnt, spielt offensichtlich die intermediäre Stoffwechselsituation in der Leber für den Insulinabbau praktisch keine Rolle.

Eine weitere hypothetische Möglichkeit einer Regulation des Insulinabbaus in der Leberzelle könnte vor dem Hintergrund der in der Einleitung erwähnten Untersuchungen von UMANA und Mitarbeitern (59, 60, 65, 66, 67) diskutiert werden. Die Autoren wiesen auf eine Abhängigkeit der Proteaseaktivität von der Konzentration der Asparaginsäure hin. Die ATP-Aktivierung der Protease soll demnach Asparaginsäure-abhängig sein, eventuell über das Aspartyladenylat. Die Konzentration an freier Asparaginsäure soll durch das Ausmaß der Proteinbiosynthese sowie durch die Aktivität des Transaminasesystems in der Leber bestimmt werden. Wenn man davon ausgeht, dann könnte man postulieren, daß unter den in der vorliegenden Arbeit erzeugten experimentellen Bedingungen, 96 Std. Hunger, Adrenalektomie und Hypophysektomie, die Konzentration an freier Asparaginsäure erhöht und damit das Aspartyladenylat erhöht ist. Wenn aufgrund einer stark verminderten Proteinbiosynthese bei den 96 Std. Hungertieren und aufgrund einer verminderten Transaminaseaktivität bei den hypophysektomierten bzw. adrenalektomierten Ratten die Konzentration der Asparaginsäure und damit wiederum das Aspartyladenylat ansteigt, dann würde dieses zu einer Steigerung der Proteaseaktivität und damit zu einem vermehrten Abbau des Insulins durch die zytoplasmatische Insulin-Protease führen können.
Bei den 96 Std. Hungertieren käme zusätzlich zu der verminderten Proteinbiosynthese hinzu, daß unter den extremen Hungerbedingungen über eine vermehrte Corticoidsekretion die Transaminaseaktivität der Leber ansteigt und damit vermehrt Oxal-

essigsäure in Asparaginsäure umgewandelt werden könnte.

Eine Corticoid-Substitution der adrenalektomierten Tiere würde dann über eine Steigerung der Transaminaseaktivität der Leber zu einem Abfall der freien Asparaginsäure und des Aspartyladenylates und damit zu einer Verminderung des proteolytischen Insulinabbaus führen.

Diese Hypothese setzt voraus, daß die von UMANA postulierte Abhängigkeit der Proteaseaktivität von der Asparaginsäurekonzentration auch für die den Insulinabbau katalysierende zytoplasmatische Protease gültig ist.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob der hier postulierten Beteiligung des Aspartyladenylates an der Regulation des proteolytischen Insulinabbaus eine biologische Bedeutung beizumessen ist.

Neben den Literaturbefunden zeigen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen, daß die Leber nicht nur eine hohe Kapazität zum Insulinabbau besitzt, sondern offensichtlich auch an der Regulation des Insulinabbaus beteiligt ist. Dieses legt die Überlegung nahe, durch Applikation von Pharmaca den Insulinabbau in der Leber zu hemmen und dadurch die bei Altersdiabetikern verminderte Insulinreserve des Pankreas indirekt zu verbessern. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen in den USA erwähnenswert, bei denen bei Altersdiabetikern operativ die Vena pancreatica mit der Vena cava verbunden wird, so daß unter Umgehung der Leber das Insulin direkt in den großen Kreislauf gelangen kann.

Eine gezielte medikamentöse Hemmung des Insulinabbaus in der Leber ist bisher nicht gelungen. Von verschiedenen Autoren wurde allerdings als ein möglicher Mechanismus der ß-zytotropen oralen Antidiabetica eine Hemmung des Insulinabbaus in der Leber angenommen. Die Befunde von MARSHALL (88), nach denen Tolbutamid den Insulinabbau in der isoliert perfundier-

ten Rattenleber hemmen soll, konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Tolbutamid war bei einer Konzentration von 20 mg% Tolbutamid im Medium sowohl in der diskontinuierlichen Perfusion als auch bei Benutzung der von MARSHALL angewandten Recycling-Technik ohne Einfluß auf den Insulinabbau. Das dem Tolbutamid wirkungsgleiche Glymidin-Na führte ebenfalls bei einer Konzentration von 20 mg% sogar eher zu einer angedeuteten Steigerung des Insulinabbaus.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zum Insulinabbau stehen im Einklang mit denen von SOLOMON und Mitarbeitern (86), nach denen Carbutamid und Tolbutamid in vivo und in vitro den Insulinabbau durch Kaninchenleber nicht beeinflussen. BOLDINGER und GRADY (87) fanden sogar bei Diabetikern unter dem Einfluß von Tolbutamid einen rascheren Abfall der Plasmakonzentration von intravenös injizierten J^{131}-Insulin.

Die Ergebnisse zum Insulinabbau an der isoliert perfundierten Leber in Gegenwart von Glucagon sprechen dafür, daß das Insulin-abbauende Enzymsystem nicht am Glucagonabbau beteiligt ist. In diesen Perfusionsversuchen wurde auf molarer Basis mit dem 100-fachen Überschuß an Glucagon bezogen auf das eingesetzte Insulin gearbeitet. Wie aus der Abbildung 33 und der Tabelle 34 hervorgeht, wird der Insulinabbau in Gegenwart der 100-fachen Menge Glucagon nicht gehemmt, sondern eher beschleunigt. Eine Erhöhung des Insulinabbaus unter dem Einfluß einer vermehrten Glucagonsekretion wäre biologisch sinnvoll, da Glucagon bei hypoglykämischen Zuständen als gegenregulatorisches Hormon wirksam wird. Neben der blutzuckererhöhenden Stimulation der Glykogenolyse über das ATP-Zyklase-System würde ein durch Glucagon bedingter, beschleunigter Insulinabbau zusätzlich gegenregulatorisch wirksam sein.

Die Befunde, nach denen der Insulinabbau bei 96 Std. nüchternen Ratten sowie bei hypophysektomierten bzw. adrenalektomierten Ratten, d. h. bei hypoglykämischen Zuständen, beschleunigt ist, könnten für eine Beteiligung des Glucagons an der Regulation

des Insulinabbaus sprechen. Die vorliegenden Befunde erlauben keine verbindliche Aussage bezüglich des möglichen Mechanismus des Glucagoneinflusses auf den Insulinabbau. Man könnte aber annehmen, daß das Glucagon einmal über eine Erhöhung des cycl-AMP-Spiegels in der Leberzelle und/oder als Membranwirksames Hormon über eine Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran für Insulin wirkt.

Die vorliegende Arbeit hat, - obgleich sie mehr Fragen aufgeworfen als beantwortet hat -, gezeigt, daß die zwischen dem Insulin-sezernierenden Pankreas und der Peripherie geschaltete Leber nicht nur wie bekannt eine hohe Kapazität zum Insulinabbau besitzt, sondern, daß auch dieser Insulinabbau einer Feinregulierung unterliegt.

Da biochemische Reaktionen am effektivsten über eine Beeinflussung der geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionen regulierbar sind, liegt auch im Falle des Insulinabbaus die Annahme nahe, daß die Permeation des Insulins durch die Leberzellmembran als eventuell geschwindigkeitsbestimmender Schritt reguliert wird. Die Regulation der Aktivität der intrazellulären insulinabbauenden Enzyme dürfte nur eine geringe Bedeutung beizumessen sein. Unter diesen Umständen würden die experimentell erzeugten Bedingungen und die endogenen Substanzen (Hormone) die Permeabilität der Leberzelle für Insulin erhöhen bzw. verringern und dadurch zu einem vermehrten oder verringerten Insulinabbau führen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit der Insulinabbau in der Leber von exogenen oder endogenen Faktoren beeinflußt wird.

Bevor das vom Pankreas sezernierte Insulin in den großen Kreislauf gelangt, muß es die Leber passieren.

Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre haben eindeutig gezeigt, daß die Leber als das wesentlichste Organ zum Insulinabbau betrachtet werden kann.

Um den in vivo-Bedingungen möglichst nahe zu kommen, wurden die Untersuchungen zum Insulinabbau an der isoliert perfundierten Leber durchgeführt. Zahlreiche Vorversuche zeigten die Brauchbarkeit des Modells der isoliert perfundierten Leber der Ratte auch zu Untersuchungen zum Insulinabbau.
Der Zusatz von Human-Erythrozyten zum Perfusionsmedium gewährleistete eine optimale Sauerstoffversorgung der Leber. Die gemessenen niedrigen Transaminasekonzentrationen im Perfusionsmedium sprachen für intakte Leberzellmembranen über die Zeit der Perfusion. Der, mit Hilfe der diskontinuierlichen Durchströmung der Leber, gemessene Insulinabbau konnte im Sinne einer "zerhackten Enzymreaktion" verstanden werden. Die nach Lineweaver-Burk graphisch ermittelten maximalen Insulin-Abbaugeschwindigkeiten wurden als Maß der Kapazität der perfundierten Leber zum Insulinabbau bzw. als Maß der Aktivität des Insulin-abbauenden Enzymsystems angenommen.

Um einen möglichen Einfluß auf den Insulinabbau in der Leber von endokrin- oder ernährungsbedingten Stoffwechselsituationen beobachten zu können, wurden vor den Perfusionsversuchen in den Ratten experimentell verschiedene Zustände erzeugt, z.B. Hunger, Adrenalektomie, Hypophysektomie und Diabetes.

Weiterhin wurde untersucht, ob der Insulinabbau in der isoliert

perfundierten Leber der Ratte durch orale Antidiabetica wie Tolbutamid oder Glymidin-Na im Perfusionsmedium beeinflußt wird. Auch wurde untersucht, ob der Zusatz von Glucagon zum Perfusionsmedium die Insulinabbaugeschwindigkeit in der Leber der 24 Std. nüchternen Ratte verändert.

Der an der isoliert perfundierten Leber der gefütterten Ratte beobachtete Insulinabbau zeigte im Vergleich zu dem Insulinabbau der Leber der 24 Std. nüchternen Ratte keine wesentliche Änderung. Ein 96 Std. dauernder Nahrungsentzug erhöhte den Insulinabbau in der Leber im Vergleich zu dem der 24 Std. nüchternen Ratte um das doppelte.

Die isoliert perfundierte Leber adrenalektomierter bzw. hypophysektomierter Ratten zeigte eine sehr erhöhte Kapazität der Leber zum Insulinabbau. Der gemessene, maximale Insulinabbau war im Vergleich zu dem der gefütterten bzw. der 24 Std. nüchternen Ratte um das 4-fache gesteigert. Nach Corticoid-Substitution ging der Insulinabbau in der Leber der adrenalektomierten Ratte wieder auf Normalwerte zurück. Eine alleinige Substitution mit Adrenalin konnte den erhöhten Insulinabbau der adrenalektomierten Ratte nicht normalisieren.

Die oralen Antidiabetica Tolbutamid oder Glymidin-Na im Perfusionsmedium zeigten keinen nennenswerten Einfluß auf den Insulinabbau der Leber der 24 Std. nüchternen Ratte.

In Gegenwart von Glucagon im Perfusionsmedium, in 100-fachem Überschuß, stieg der Insulinabbau in der Leber der 24 Std. nüchternen Ratte gering an.

Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Befunde zeigen, daß die Leber nicht nur eine hohe Kapazität zum Insulinabbau besitzt, sondern, daß der beobachtete Insulinabbau auch einer Feinregulation unterliegt.

Die Beobachtungen sprechen dafür, daß die Höhe des Insulin-

abbaus nicht über eine Steigerung oder Hemmung der Aktivität des intrazellulären Insulin-abbauenden Enzymsystems reguliert wird, sondern, daß eventuell die Penetration des Insulinmoleküls in die Leberzelle über eine Änderung der Permeabilität der Zellmembran erfolgt, im Sinne einer Steigerung oder Verminderung.

6. LITERATURANGABEN

1. GREELEY, P.O.
Amer. J. Physiol. 129, 17 (1940)

2. MIRSKY, I.A., PODORE, C.J., WACHMANN, J. und BROH-KAHN, R.H.
J. Clin. Invest. 27, 515 (1948)

3. HAUGAARD, N., VAUGHAN, M., HAUGAARD, E.S. und STADIE, W.C.
J. Biol. Chem. 208, 549 (1954)

4. MIRSKY, I.A. und BROH-KAHN, R.H.
Arch. Biochem. 20, 1 (1949)

5. MIRSKY, I.A. und PERISUTTI, G.
Endocrinology 52, 698 (1953)

6. BRUGSCH, T. und HORSTERS, H.
Biochem. Z. 188, 147 (1927)

7. LEHMANN, H. und SCHLOSSMAN, H.J.
J. Physiol. 94, 15 (1938) London

8. MIRSKY, I.A. und BROH-KAHN, R.H.
Federation Proc. 7, 14 (1948)

9. MIRSKY, I.A.
Ciba Foundation Colloquia Endocrinology London 6, 263 (1953)

10. BROH-KAHN, R.H. und MIRSKY, I.A.
Arch. Biochem. 20, 10 (1949)

11. STADIE, W.C., HAUGAARD, N., VAUGHAN, M.
J. Biol. Chem. 200, 745 (1953)

12. LEE, N.D. und WILLIAMS, R.H.
Endocrinology 54, 5 (1953)

13. MIRSKY, I.A., PERISUTTI, G. und DIXON, F.J.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 86, 228 (1954)

14. MIRSKY, I.A., PERISUTTI, G. und DIXON, F.J.
J. Biol. Chem. 214, 397 (1955)

15. MIRSKY, I.A.
Recent Progress in Hormone Research XIII, 129 (1957)

16. GESCHWIND, I.I. und LI, C.H.
Endocrinology 50, 226 (1952)

17. SNEDECOR, J.G. und MacGRATH, W.B.Jr.
Anat. Record 113, 588 (1952)

18. ELGEE, N.J. und WILLIAMS, R.H.
Diabetes 4, 87 (1955)

19. BEYER, E.R.
Acta Endocrinology 19, 309 (1955)

20. MIRSKY, I.A., PERISUTTI, G. und DIENGOTT, D.
Metabolism Clin. und Exptl. 5, 156 (1956)

21. MIRSKY, I.A., PERISUTTI, G. und JINKS, R.
Endocrinology 56, 484 (1955)

22. ELGEE, N.J. und WILLIAMS, R.H.
Diabetes 4, 8 (1955)

23. CHASE, H.B., GUNTHER, M.S., MILLER, J. und WOLFFSON,D.
Sience 107, 297 (1948)

24. MIRSKY, I.A., SIMKIN, B. und BROH-KAHN, R.H.
Arch. Biochem. 28, 415 (1950)

25. MIRSKY, I.A., DIENGOTT, D. und PERISUTTI, G.
Abstr. Am. Chem. Soc. 129th Mtg. Dallas (Tex.), 1956

26. MIRSKY, I.A. und PERISUTTI, G.
Sience 122, 559 (1955)

27. TYBERGHEIN, J.M., HALSEY, Y.D. und WILLIAMS, R.H.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 92, 322 (1956)

28. MIRSKY, I.A. und PERISUTTI, G.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 94, 589 (1957)

29. MIRSKY, I.A., PERISUTTI, G. und DIENGOTT, D.
Endocrinology 60, 303 (1957)

30. ROSEN, D.A., MAENGWYN-DAVIES, G.D., BECKER, B., STONE,H.H. und FRIEDENWALD, J.S.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 88, 321 (1955)

31. TOMIZAWA, H.H. und HALSEY, Y.D.
J. Biol. Chem. 234, 307 (1959)

32. RACKER, E.
Federation Proc. 12, 711 (1953)

33. NARAHARA, R.T. und WILLIAMS, R.H.
J. Biol. Chem. 233, 1034 (1958)

34. VARANDANI, P.T. und TOMIZAWA, H.H.
Biochem. Biophys. Acta 113, 498 (1966)

35. TOMIZAWA, H.H. und VARANDANI, P.T.
J. Biol. Chem. 240, 3191 (1965)

36. VARANDANI, P.T. und NAFZ, M.A.
Diabetes 18, 176 (1969)

37. ANSORGE, S., BOHLEY, P., KIRSCHKE, H., LANGNER, J. und HANSON, H.
Eur. J. Biochem. 19, 283 (1971)

38. ANSORGE, S., KAISER, B., SENGER, U., BOHLEY, P., LANGNER, J. und KIRSCHKE, H.
Acta Biol. Med. Germ. 28, 761 (1972)

39. ANSORGE, S., BOHLEY, P., KIRSCHKE, H., LANGNER, J., WIEDERANDERS, B. und HANSON, H.
Eur. J. Biochem. 32, 27 (1973)

40. BOHLEY, P., MIEHE, C., MIEHE, M., ANSORGE, S., KIRSCHKE, H., LANGNER, J. und WIEDERANDERS, B.
Acta. Biol. Med. Germ. 28, 323 (1972)

41. HARGER, E. und ANFIENSEN, C.B.
J. Biol. Chem. 237, 1839 (1962)

42. GIVOL, D., GOLDBERG, R.F. und ANFIENSEN, C.B.
J. Biol. Chem. 239, P.C. 3114 (1964)

43. BRUSH, J.S. und KITABCHI, A.E.
Biochem. Biophys. Acta 215, 134 (1970)

44. BRUSH, J.S. und CHENG, E.W.K.
Federation Proc. 27, 495 (1968)

45. BRUSH, J.S.
Diabetes 20, 140 (1970)

46. BURGHEN, G.A., KITABCHI, A.E. und BRUSH, J.S.
Endocrinology 91, 633 (1972)

47. TOMIZAWA, H.H., NUTLEY, M.L., NARAHARA, H.T. und WILLIAMS, R.H.
J. Biol. Chem. 214, 285 (1955)

48. KITABCHI, A.E. und STENTZ, F.B.
Diabetes 21, 1091 (1972)

49. IZZO, J.L., RONCONE, A., IZZO, M.J., FOLEY, R. und BARTLETT, J.W.
J. Biol. Chem. 247, 1219 (1972)

50. VAUGHAN, M.
Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 15, 432 (1954)

51. PROUT, T.E.
Metabolism 12, 673 (1963)

52. TOMIZAWA, H.H. und WILLIAMS, R.H.
J. Biol. Chem. 217, 685 (1955)

53. TOMIZAWA, H.H. und HALSEY, Y.D.
J. Amer. Chem. Soc. 76, 3357 (1954)

54. NARAHARA, H.T., EVERETT, N.B., SIMONS, B.S. und WILLIAMS, R.H.
J. Biol. Chem. 234, 71 (1959)

55. KENNY, A.J.
Biochem. J. 69, 32 (1958)

56. KENNY, A.J.
Brit. Med. Bull. 16, 202 (1960)

57. RUDMAN, D., GRACIA, L.A., DiGIROLAMO, M. und SHANK, P.W.
J. clin. Invest. 44, 1093 (1965)

58. RUDMAN, D., GRACIA, L.A., DiGIROLAMO, M. und SHANK, P.W.
Endocrinology 78, 169 (1966)

59. UMANA, C.R.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 31 (1971)

60. UMANA, C.R. und FELDMAN, G.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 28 (1971)

61. SIMPSON, N.V.
J. Biol. Chem. 201, 143 (1953)

62. STEINBERG, D. und VAUGHAN, M.
Arch. Biochem. Biophys. 65, 93 (1956)

63. AHN, G.S. und ROSENBERG, I.N.
Endocrinology 81, 1319 (1967)

64. PENN, N.W.
Biochem. Biophys. Acta 37, 55 (1966)

65. UMANA, C.R.
Anal. Biochem. 26, 430 (1968)

66. UMANA, C.R. und FELDMAN, G.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 25 (1971)

67. UMANA, C.R.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 925 (1970)

68. WILLIAMS, R.H., HAY, J.S. und TJADEN, M.B.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 74, 513 (1959)

69. ELGEE, N.J., WILLIAMS, R.H., LEE, N.D., WANG, T. und HOGNESS, J.R.
Diabetes 2, 370 (1953)

70. BROH-KAHN, R.H., SIMKIN, B. und MIRSKY, I.A.
Arc. Biochem. 27, 174 (1950)

71. MORGAN, C.R. und WIESMAN, H.J.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127, 763 (1968)

72. MORGAN, C.R., SPAHN, J., FRAZIER, V. und FLEITZ, S.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 128, 795 (1968)

73. De BARBIERI, A. und GRASSI, M.
Farm. sci. e. tec. (Pavia) Bd. 5, 394 (1950)
Bd. 6, 170 (1951)

74. UETE, T. und TSUCHIKURA, H.
J. Biochem. 72, 157 (1972)

75. SKINNER, W. und MADISON, L.L.
Clin. Res. 8, 247 (1960)

76. MAHLER, R.J. und SZABO, O.
Clin. Res. 15, 456 (1967)

77. ELGEE, N.J. und WILLIAMS, R.H.
Amer. J. of Phys. 180, 15 (1954)

78. SAMOLS, E. und RYDER, J.A.
J. clin. Invest. 47, 1947 (1968)

79. KANEKO, R. und KOSAKA, K. und NAKAO, K.
Endocrinology 80, 530 (1967)

80. KANAZAWA, Y., QUZUYA, T., IDE, T. und KOSAKA, K.
Amer. J. physiol. 211, 442 (1966)

81. KAPLAN, N. und MADISON, L.L.
Clin. Res. Bd. 7, 248 (1959)

82. MORTIMORE, G.E. und TIETZE, F.
Metabolism 8, 479 (1956)

83. MORTIMORE, G.E.
Amer. N.Y. Acad. Sci. 82, 329 (1959)

84. STOLL, R.W., TOUBER, J.L. MENAHAN, L.A. und
WILLIAMS, R.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 894 (1970)

85. RUBENSTEIN, A.H., POTTENGER, L.A., MAKO, M., GETZ, G.
und STEINER, D.F.
J. clin. Invest. 51, 912 (1972)

86. SOLOMON, A., BERSON, A.S., YALOW, R.S., WEISENFELD, S.,
GOLDNER, M.G. und VOLK, B.W.
Diabetes 6, 54 (1957)

87. BOLLINGER, R.E. und GRADY, H.J.
Amer. J. med. Sci. 233, 182 (1957)

88. MARSHALL, A., GINGERICH, E., RONALD, R.L., WRIGHT, P.H.
Metabolism 19, 1046 (1970)

89. MILLER, L.L., BLY, C.G., WATSON, M.L. und BALE, W.F.
J. exp. Med. 94, 431 (1951)

90. BRAUER, R.W., PESSOTTI, R.L. und PIZZOLATO, P.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 78, 174 (1951)

91. HOHORST, H.J., KREUTZ, F.H. und BÜCHER, Th.
Biochem. Z. 332, 18 (1959)

92. SCHIMASSEK, H.
Life Sciences 11, 629 (1962)

93. SCHIMASSEK, H.
Life Sciences 11, 635 (1962)

94. SCHIMASSEK, H.
Biochemische Z. 336, 460 (1963)

95. SCHIMASSEK, H.
Biochem. Z. 336, 468 (1963)

96. GLOGNER, P., NIETH, H., WAGNER, H. und GLOEDE, K.
Klin. Wschr. 17, 1040 (1966)

97. HEMS, R., ROSS, B.D., BERRY, M.N. und KREBS, H.A.
Biochem. Z. 101, 284 (1966)

98. FRIMMER, M. und KRAMER, R.
Z. Ges. Exp. Med. 152, 269 (1970)

99. MEIERS, H.G. und STAIB, W.
Biochem. Z. 344, 514 (1966)

100. SCHRIEFERS, H. und KORUS, W.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 318, 239 (1960)

101. MORTIMORE, G.E., TIETZE, F. und STETTEN, De WITT
Diabetes 8, 307 (1959)

102. SOLOMON, S.S., FENSTER, F., ENSINCK, J.W. und
WILLIAMS, R.H.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 126, 166 (1967)

103. ABRAHAM, R. und DAWSON, W.
J. Physiol. 192, 2 (1967)

104. GERSHOFF, S.N., WEICH, N.L. und ANTONIADES, H.N.
Diabetes 19, 296 (1970)

105. RUBENSTEIN, A.H., POTTENGER, L.A., MAKO, M., MELANI, F.
und STEINER, D.F.
J. Clin. Invest. 49, 83a (1970)

106. MARSHALL, A., GINGERICH, R.L. und WRIGHT, P.H.
Clin. Res. 18, 33 (1970)

107. McCARDLL, A.M. und BUCHANAN, K.D.
Diabetologia 9, 174 (1973)

108. HERR, R.R., JAHNKE, H.K. und ARGOUDELIS, A.D.
J. Amer. Chem. Soc. 89, 4808 (1967)

109. RANDLE, P.J. und SMITH, G.H.
Biochem. J. 70, 490 (1958)

110. RANDLE, P.J. und SMITH, G.H.
Biochem. J. 70, 501 (1958)

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. E. Gerhards in den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen.

Herrn Prof. Gerhards bin ich ganz besonders dankbar für die in zahlreichen Gesprächen erhaltenen wertvollen Anregungen, die die vorliegende Arbeit so entscheidend beeinflußten.

Herrn Prof. Dr. Keller, ehemals vom II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin, danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit.

Herrn G. Irrgang danke ich für seine hilfreiche Assistenz bei der Durchführung der Perfusionsversuche.

LEBENSLAUF

14.8.1946	in Lüneburg als dritte Tochter des Rechtsanwalts und Notars Dr. Friedrich Flacke geboren
1953 - 57	Besuch der Volksschule
1957	Aufnahme in die Wilhelm-Raabe-Schule, neusprachliches und naturwissenschaftliches Gymnasium für Mädchen, in Lüneburg
1959	Tod des Vaters
1966	Abitur, Beginn mit dem Studium der Biologie an der Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der Freien Universität Berlin
1969	Vordiplom
1970	Beginn mit den experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation in den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198